

DER MULTIENZYMKOMPLEX FETTSÄURE- SYNTHETASE AUS HEFE

**Ein Modell des Kettenabbruches in der
Fettsäurebiosynthese
Dissoziation und Rekonstitution des Komplexes**

Manfred Sumper

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548328_0016

DER MULTIENZYMKOMPLEX FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

Ein Modell des Kettenabbruches in der Fettsäurebiosynthese

Dissoziation und Rekonstitution des Komplexes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Manfred Sumper

München 1970



Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 4. 1970

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max Planck Institut für Zellchemie in der Zeit von Mai 1967 bis Dezember 1969 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir jederzeit zuteil werden ließ.

Frl. C. Riepertinger danke ich für ihre wertvolle und zuverlässige Mitarbeit seit Juni 1968.

Herrn Dr. D. Oesterhelt bin ich für die enge Zusammenarbeit bei der Ableitung des Kettenabbruch-Modells und für zahlreiche Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung.....	1
II.	Die Länge des molekularen "Schwingarmes"	
	4'-Phosphopantethein.....	6
III.	Untersuchungen mit Ellman's-Reagens (DTNB).....	7
	1. Die Thiolgruppen der Fettsäuresynthetase.....	7
	2. Die nicht-thioesterartigen Acceptor-Gruppen	
	der Fettsäuresynthetase	8
	a) Vorbemerkungen	8
	b) Deacylase-Aktivität der FSS	9
	c) Beladung mit Malonyl-CoA	13
	d) Beladung mit Acetyl-CoA	14
	3. Diskussion	16
IV.	Ein Modell des Kettenabbruches in der Fettsäurebiosynthese und	
	seine experimentelle Prüfung.....	18
	1. Vorbemerkungen	18
	2. Ableitung des Modells	20
	3. Produktverschiebungen durch Variation der Acetyl- und Malonyl-	
	CoA-Konzentration.....	26
	4. Die Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel	28
	5. Beeinflussung des Geschwindigkeitsverhältnisses von Kondensation	
	und Transfer durch Guanidin · HCl	29
	6. β -Ketoacyl-CoA- und α , β -ungesättigte Acyl-CoA-Verbindungen	
	als Endprodukte der Fettsäuresynthese	33
	a) Vorbemerkungen.....	33
	b) Die Fettsäuresynthese mit NADH als Coenzym	34
	α) Kinetik und Endproduktanalyse	34
	β) Charakterisierung der unbekannten Endprodukte	37
	c) Die Fettsäuresynthese mit limitierenden Mengen NADPH	45
	α) Endproduktanalyse	45
	β) Charakterisierung der unbekannten Endprodukte	47

7. Zusammenfassende Diskussion des Modells	52
8. Der Einfluß der Parameter Temperatur und pH auf das Produkt- muster der Fettsäuresynthese	54
a) Temperatur	54
b) Der pH-Einfluß	55
V. Die Fettsäuresynthese mit Substratmodellen	56
VI. Dissoziation und Rekonstitution des Multienzymkomplexes	63
1. Spaltung durch Einfrieren und Auftauen salzhaltiger Enzymlösungen	63
2. Verhalten der enzymatischen Aktivität	66
3. Reaktivierungsparameter	68
4. Vergleich native/rekonstituierte Fettsäuresynthetase	70
5. Versuche zur Charakterisierung der Spaltstücke	72
6. Diskussion	78
VII. Experimentelle Einzelheiten	81
1. Geräte	81
2. Käufliche Chemikalien, Substrate und Enzyme	82
3. Synthese von Substraten	83
a) Acyl-CoA-Derivate	83
b) Sonstige Präparate und Substrate	83
4. Allgemeine analytische Methoden	84
a) Proteinbestimmung	84
b) Gehaltsbestimmung von Thioestern	85
c) Radioaktivität	85
5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresynthetase	86
6. Zu Kapitel II	87
a) Darstellung von p-Brombenzoylpantethein	87
♂) Synthese der benötigten Ausgangssubstanzen	87
♂) Synthese von p-Brombenzoylpantethein	88
♀) Charakterisierung des p-Brombenzoylpantetheins	89
7. Zu Kapitel III	91
a) SH-Gruppen der Fettsäuresynthetase	91
b) Messung der Deacylaseaktivität der Fettsäuresynthetase	91

c) Beladungsversuche der Fettsäuresynthetase	91
8. Zu Kapitel IV	92
a) Radiogaschromatographie	92
α) Bereitung des Säulenfüllmaterials	92
β) Füllung der Trennsäule	92
γ) Gaschromatographie	93
δ) Auswertung und Kontrollen	93
b) Standardansatz der enzymatischen Fettsäuresynthese	95
c) Aufarbeitung der Inkubationslösung für die Radiogaschromato- graphie	95
d) Synthese ungeradzahlicher Fettsäuren	96
e) Endproduktverschiebungen durch Variation der Acetyl- und Malonyl-CoA-Konzentration	96
f) Die Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel ...	96
g) Endproduktverschiebungen durch Guanidin · HCl	97
h) 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Methyltridecylketons	98
i) Semicarbazon des Methyltridecylketons	98
k) Überführung der Ketone in die entsprechenden Alkohole und deren Methylätherderivate	98
l) Die Endprodukte der Fettsäuresynthese mit limitierenden Mengen NADPH	99
m) Oxidativer Abbau des 2-Hexadecensäuremethylesters,	99
n) Synthese von 2-Hexadecensäure durch FMN-freie Fett- säuresynthetase	99
9. Zu Kapitel V	100
a) Michaeliskonstanten der Substratmodelle	100
b) Syntheseprodukte mit Substratmodellen	100
c) Triacetsäurelaktonebildung mit Substratmodellen	100
10. Zu Kapitel VI	101
a) Dissoziation der Fettsäuresynthetase	101
b) Rekonstitution der gespaltenen Fettsäuresynthetase	101

c) Diskelektrophorese	102
d) Analytische Ultrazentrifuge	106
e) Zuckergradientenzentrifugation	106
f) Fettsäuresynthetase-Test	107
g) Enzymtest der 1. Reduktion	107
h) Enzymtest der 2. Reduktion	107
i) Aktivitätsbestimmung der Katalase im Zuckergradienten.....	107
k) ^{14}C -Fettsäuresynthetase	108
VIII. Zusammenfassung	110
IX. Literaturverzeichnis	111
Lebenslauf	118

Verwendete Abkürzungen

FSS	Fettsäuresynthetase
Synthetase	"
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
CoA, CoA-SH	Coenzym A
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
Mal-CoA	Malonyl-Coenzym A
FMN	Flavinmononucleotid
ATP	Adenosintriphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
μ	mikro
mg	Milligramm
g	Gramm
E, mE	Einheit, Millieinheit, Extinktion
Δ E	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
DTNB	5, 5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
ACP	acyl carrier protein
NPGS	Neopentylglykolsuccinat
POPOP	1, 4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
PPO	2, 5-Diphenyloxazol

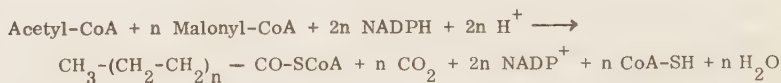
I. Einleitung

Ein beträchtlicher Teil der in der Zelle vorkommenden Enzyme ist fest an oder in Membranen gebunden. Bis in die jüngste Zeit nahm man an, daß die nicht gebundenen Enzyme mehr oder weniger zufällig, statistisch über die flüssigen Phasen der Zelle verteilt seien. Mit der Entwicklung neuer Techniken wie Zellfraktionierung und Elektronenmikroskopie, zeigte sich jedoch immer klarer, daß diese sog. "löslichen" Enzyme keineswegs statistisch über die Zelle verstreut sind, sondern vielmehr in funktionellen Einheiten organisiert und lokalisiert sind (1). Die biochemische Forschung interessiert sich mehr und mehr dafür, Einblick in die molekulare Architektur dieser subcellulärer Strukturen zu gewinnen. Eine erste Stufe der Organisation ist die Zusammenfassung von Reaktionsketten in diskreten Multienzymkomplexen. Andere "lösliche" Enzyme, wie das Glykolyse-System, scheinen in der intakten Zelle mehr oder weniger fest an Membranstrukturen angelagert zu sein (2). In jedem Falle ist die Folge der Organisation, Lokalisation oder Compartmentierung der Enzyme. Nur so können die vielfach ineinander verknüpften Synthese- und Abbauewege wirksam kontrolliert und reguliert und damit eine optimale Funktion der Zelle erreicht werden. Die einfache Unterteilung der Zelle in Kern, Membranen und Cytoplasma ist mit der Entdeckung der zahlreichen cytoplasmatischen Strukturen oder Organellen wie Mitochondrien, Ribosomen und Liposomen unzureichend geworden.

Die einfachste Form subcellulärer Organisation sind die Multienzymkomplexe, wie sie in den α -Ketosäuredehydrogenasen (3) oder in den Fettsäuresynthetasen (4-7) verwirklicht sind. Diese Komplexe haben eine definierte Morphologie und katalysieren eine koordinierte Folge von Reaktionen. Die Proteinbausteine dieser Komplexe haben neben dem aktiven Zentrum für die Katalyse Bindungsstellen, welche die Assoziation mit definierten Nachbarenzymen ermöglichen. Diese Eigenschaft macht sie zu geeigneten Studienobjekten für die Untersuchung der Organisation und Koordination funktioneller Einheiten.

Im Laboratorium von LYNEN wurde beim Studium der Fettsäurebiosynthese ein stabi-

ler Multienzymkomplex aus Hefe isoliert, der die Synthese von Palmityl- und Stearyl-CoA aus Acetyl- und Malonyl-CoA nach folgender Bruttogleichung katalysiert (5, 8):



Dieser Multienzymkomplex verhält sich bei Proteinfractionierungen, im Schwerfeld und im elektrischen Feld als einheitliches Proteinmolekül vom Molekulargewicht $2,3 \cdot 10^6$.

Die Synthese der Fettsäuren bzw. ihrer CoA-Derivate erfordert sieben verschiedene Reaktionsschritte, die mit Hilfe von Substratmodellen nachgewiesen wurden. Sämtliche Reaktionen verlaufen in kovalenter Bindung der Substrate und Zwischenprodukte am Multienzymkomplex. Erst die Endprodukte der Synthesekette, Palmitin- und Stearinsäure werden auf CoA zurückübertragen (9).

Entscheidende Bedeutung kommt im Syntheseprozess zwei verschiedenen Thiolgruppen am Enzym zu. Sie wurden von LYNEN als "zentrale" und "periphere" SH-Gruppe bezeichnet. Die zentralen SH-Gruppen (nach (10) enthält 1 Mol FSS mindestens 5 Mol 4'-Phosphopantethein) sind Bestandteil von 4'-Phosphopantetheinmolekülen, die über Serinreste an Proteinkomponenten gebunden sind, deren Eigenschaften und Funktion nach Untersuchungen von WILLECKE dem von VAGELOS erstmals aus E. coli isolierten "acyl carrier protein" ähneln (11, 12). Bedingt durch seine chemische Konstitution wird dem 4'-Phosphopantethein die Funktion eines Schwingarmes zugeschrieben. Die an seinem SH-Ende gebundenen Zwischenprodukte können so den aktiven Zentren der Teilenzyme zugeführt werden (13) (Fig. 1). Die mit diesem Konzept zu fordernde Hohlraumstruktur der Fettsäuresynthetase konnte neuerdings mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung bewiesen werden (14).

Die peripheren SH-Gruppen sind Bestandteil von Cysteinmolekülen im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym (23). Bei Beladungsversuchen des Enzymkomplexes

mit Malonyl- und Acetylresten wurden von SCHWEIZER (15) neben den erwähnten Thiolgruppen weitere Acceptorstellen gefunden, die wegen ihres chemischen Verhaltens keine Thiolgruppen sein konnten. Aus einer Vielzahl von Experimenten (16) wurde der Schluß gezogen, daß diese Acceptorgruppen im aktiven Zentrum der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase lokalisiert sind. Sie wurden mit X-, Y- und Z-Gruppe bezeichnet.

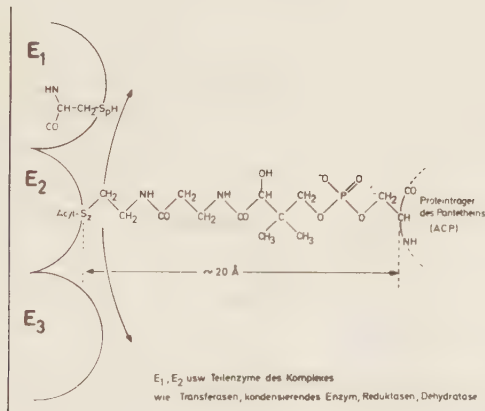


Fig. 1: Chemische Natur der "peripheren" und "zentralen" SH-Gruppe (S_H und S_Z).

Die Synthese der Fettsäuren beginnt mit der Übertragung eines Acetylrestes aus Acetyl-CoA durch die Transferase (X-Gruppe) über die zentrale zur peripheren SH-Gruppe. Dieser Acetylrest kondensiert mit einem auf die zentrale SH-Gruppe übertragenen Malonylrest unter CO_2 -Abspaltung zum Acetylmalonylrest, der nun thioesterartig am Pantethein (am "Schwingarm") der zentralen SH-Gruppe gebunden ist.

Reduktion mit NADPH als Coenzym zum β -Hydroxybutyrylrest, Dehydratisierung zum Crotonylrest und Hydrierung mit FMNH₂ als Coenzym zum Butyrylrest beenden den ersten Cyclus der Synthese. Der gesättigte Acylrest wird nun auf die periphere SH-Gruppe zurückübertragen und es beginnt ein zweiter Reaktionscyclus, der durch die erneute Kondensation mit einem Malonylrest eingeleitet wird (Fig. 2). Nach 7 bis 8 solchen Reaktionscyclen wird der Syntheseprozess durch Übertragung des gebildeten Palmityl- bzw. Stearylrestes auf CoA abgebrochen. Der Acetylrest, als Starter der Fettsäuresynthese, wird also sukzessive durch C₂-Einheiten aus Malonyl-CoA verlängert.

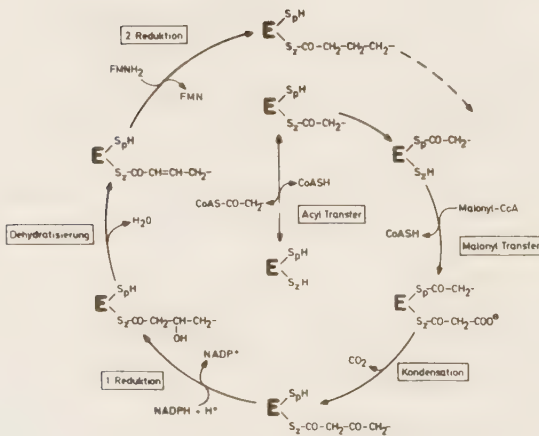


Fig. 2: Reaktionsschema der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich im ersten Teil mit der Frage, wie die Koordination der Enzyme ermöglicht, daß ausschließlich der Palmityl- und Stearylrest als Endprodukte der Fettsäurebiosynthese auftreten.

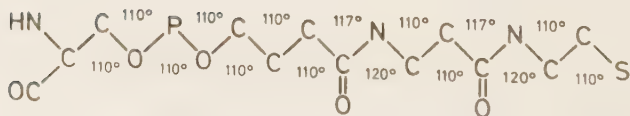
Im zweiten Teil wird über die Spaltung des Multienzymkomplexes in Untereinheiten und deren Rekonstitution zum aktiven Enzym berichtet.

II. Die Länge des molekularen "Schwingarmes" 4'-Phosphopantethein.

Im Multienzymkomplex FSS bildet das proteingebundene 4'-Phosphopantethein einen flexiblen Schwingarm für die an seinem SH-Ende kovalent gebundenen Synthese-Zwischenprodukte, wie bereits einleitend (S. 2) beschrieben wurde. Obgleich die Zwischenprodukte damit zwischen den aktiven Zentren der Teilenzyme frei beweglich sind, werden sie dennoch auf ein Volumenelement der Größenordnung einer FSS-Molekel ($\approx 8 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3$) fixiert. Diese Fixierung entspricht formal einer "Konzentration" aller Synthese-Zwischenprodukte, die bereits im Enzymsättigungsbereich liegt ($\approx 10^{-4}$ bis 10^{-3} M).

Um den Mindestradius abzuschätzen, den der Schwingarm 4'-Phosphopantethein überstreichen kann, wurde die Länge dieses Moleküls aus bekannten Bindungslängen und Bindungswinkeln berechnet. Folgende Werte wurden der Berechnung zu Grunde gelegt:

C-C	1,54 Å	(17)
C-O	1,42 Å	(17)
P-O	1,6 Å	(18)
C-S	1,81 Å	(aus Kovalenzradien nach Schomaker-Stevenson (19))



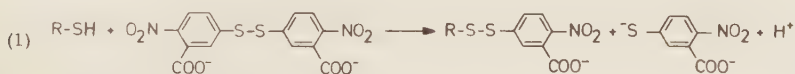
Aus diesen Daten errechnet sich eine Länge des Schwingarmes von 20 Å.

Es ist beabsichtigt, eine Röntgenstrukturanalyse eines Pantethein-Schweratom-Derivates ausführen zu lassen. Als hierfür geeignetes Schweratomderivat wurde das p-Brombenzoylpantethein, wie im exp. Teil beschrieben, synthetisiert.

III. Untersuchungen mit Ellman's Reagens (DTNB).

1. Die Thiolgruppen der FSS.

Thiole reagieren quantitativ mit Ellmans Reagens (5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoesäure) nach Gleichung 1 unter Freisetzung des tiefgelben Thiophenolanions ($\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ m}\mu$), wodurch eine



optische Bestimmung von Thiolgruppen möglich ist (20). Die Reaktion mit niedermolekularen Thiolen ist für klassische Methoden "unmeßbar" rasch, so daß lediglich der Extinktionsendwert bestimmt werden kann.

Für Proteinthiolgruppen ist eine solche schnelle Reaktion nur für weitgehend freiliegende Thiolgruppen zu erwarten, während solche die durch die gegebene Tertiärstruktur (und Quartärstruktur) vom umgebenden Lösungsmittel mehr oder weniger abgeschirmt sind, langsam oder nicht mit Ellmans Reagens reagieren sollten. Um die Gesamtzahl der Enzymthiolgruppen zu ermitteln, ist eine Zerstörung der nativen Konformation notwendig. Dies wurde mit Harnstoff und Desoxycholat erreicht (s. auch S. 65). In Fig. 3 sind die Reaktionskinetiken für natives und denaturiertes Enzym dargestellt. In 6 M Harnstoff scheint die native Struktur so weitgehend zerstört zu sein, daß nahezu alle Thiolgruppen schnell abreagieren. Wiederholte Messungen dieses Endwertes lagen zwischen 130 und 140 Thiolgruppen pro FSS-Molekel (bezogen auf $M = 2,3 \cdot 10^6$). Die native Konformation erlaubt dagegen nur die "spontane" Reaktion von 5 bis 10 Thiolgruppen. Selbst nach 16 Stunden sind erst 60 % der Thiolgruppen erfaßt. Eine von OESTERHELT ausgeführte Aminosäureanalyse der FSS ergab ca. 140 Cysteine pro Molekel (21). Diese Befunde schließen eine größere Anzahl von Disulfidbrücken im Enzym aus, so daß die ungewöhnlich hohe Stabilität des Multienzymkomplexes wohl nicht auf diesem Weg erreicht wird.

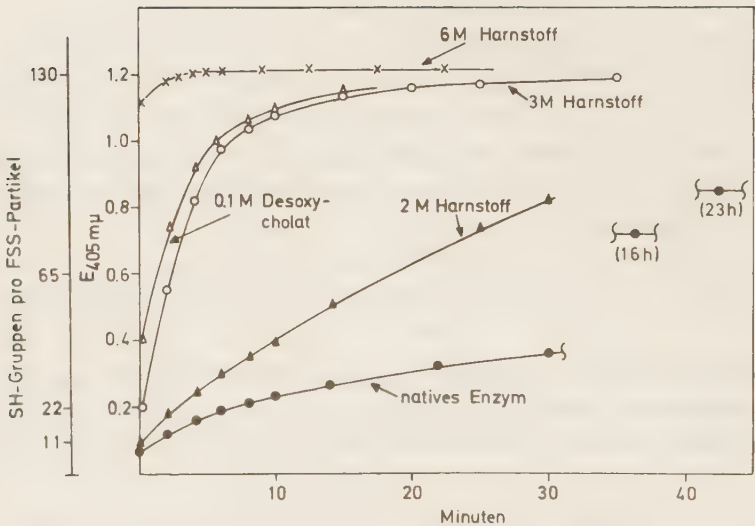


Fig. 3: Reaktionskinetik der Enzymthiolgruppen von
nativer und denaturierter Fettsäuresynthetase mit DTNB.
(Ausführung siehe S. 91)

2. Die nicht-thioesterartigen Acceptor-Gruppen der FSS.

a. Vorbemerkungen:

Die Inkubation der Fettsäuresynthetase mit 10^{-3} M Ellmans Reagens blockiert alle reaktiven Thiolgruppen. Das so modifizierte Enzym bietet sich für die Untersuchung der nicht-thioesterartigen, kovalenten Substratbindungsstellen an, die von SCHWEIZER (15) bei Perameisensäureoxidationen des mit radioaktiven Substraten beladenen Enzyms gefunden wurden.

Um so mehr bietet sich diese Methode an, da die Inkubation mit DTNB keine entscheidende Konformationsänderung des Enzyms bewirken kann, wie folgende Befunde nahelegen:

Das mit DTNB vorinkubierte Enzym erweist sich

1/ im Schwerfeld der analytischen UZ noch nach zwei Stunden Inkubationsdauer ununterscheidbar von nativem Enzym.

2/ im Aktivitätstest der 1. Reduktion ebenso aktiv wie unbehandelte FSS.

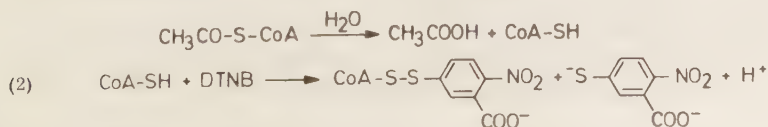
3/ Die Fettsäuren synthetisierende Aktivität wird natürlich mit der Blockierung der SH-Gruppen vollständig gehemmt. Mit 10^{-3} M DTNB findet man nach 10 Minuten noch 10 % Restaktivität (16). Die Hemmung ist jedoch reversibel, so wird z. B. selbst nach 24 stündiger DTNB-Einwirkung das Enzym mit 0,1 M Cystein zu 55 % der maximalen Aktivität reaktiviert (Tab. 1).

10^{-3} M DTNB Einwirkungsdauer	Reaktivierung % der max. Aktivität
1 h	90
24 h	55
120 h	25

Tabelle 1: Reaktivierung DTNB-inaktivierter Fettsäuresynthetase.

b. Die Deacylaseaktivität der FSS

OESTERHELT bediente sich zum Nachweis einer katalytischen Nebenreaktion der FSS, der Decacylierung von Acetyl-CoA nach Gleichung 2;



der Farbreaktion von Thiolen mit DTNB (16). Die Extinktionszunahme konnte in einem kontinuierlichen Test bei 405 m μ ($\epsilon = 13300 \text{ mMol/cm}^2$) verfolgt werden. Die Deacylaseaktivität für Acetyl-CoA beträgt 1,0 - 2,0 mE/mg (1 E = 1 μMol Acetyl-CoA deacyliert pro Minute bei 25°C), also ca. 1/1000 der FSS-Aktivität und wurde von OESTERHELT als Nebenreaktion der Acetyltransferase ("Y-Gruppe") interpretiert.

Wir setzten neben Acetyl-CoA noch Propionyl-CoA und verschiedene längerkettige Acyl-CoA-Derivate für diesen Deacylasetest ein. Interessanterweise nimmt die Deacylaseaktivität mit wachsender Kettenlänge stark ab, bereits beim Capryloyl-CoA ist sie gegen Null abgesunken (Fig. 4). Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung, daß bei sauberen Enzympräparationen ausschließlich die CoA-Derivate (bzw. Thioesterderivate, s. S. 56) der Endprodukte auftreten und nicht die freien Säuren, daß also die Abschlußreaktion nicht eine Hydrolyse, sondern eine Übertragung darstellt.

Beim optischen Test der Deacylaseaktivität mit DTNB beobachtet man unmittelbar nach Reaktionsstart mit Substrat keine lineare Extinktionszunahme, sondern einen steilen Extinktionsanstieg, der dann in den linearen Lauf - entsprechend der Deacylaseaktivität - übergeht (Fig. 5).

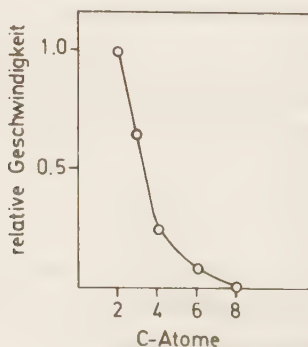


Fig. 4: Deacylaseaktivität der Fettsäuresynthetase in Abhängigkeit der Kettenlänge des Acyl-CoA-Substrates (Ausführung siehe S. 91)

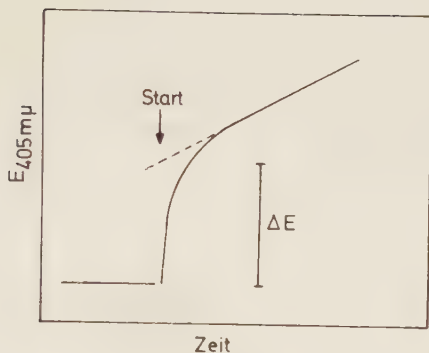
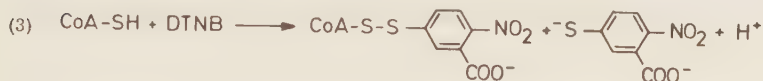


Fig. 5: Zeitlicher Extinktionsverlauf beim optischen Test der Deacylaseaktivität (Ausführung siehe S. 91).

Qualitativ entspricht dieser zeitliche Extinktionsverlauf der Erwartung: Bei Substratzugabe wird das Enzym nach Gleichung 3



unter Freisetzung von CoA-SH beladen; dieses CoA addiert sich beim Start dem durch Deacylierung entstehenden CoA. Aus der Größe dieses überlagerten Extinktionsanstieges sollte man umgekehrt auf die Zahl der Substratbindungsstellen zurückschließen können.

Als unbedingte Voraussetzung für derartige Versuche mußte eine Extinktionsänderung durch eingeschleppte Thiole bei der Substratzugabe verhindert werden. Eine Kompensation durch Referenzküvetten wäre prinzipiell möglich; Die gemessene Extinktionsänderung wäre dann aber u. U. die Differenz sehr großer Absolutextinktionen in Meß- und Referenzküvette, so daß Fehlmessungen wahrscheinlich wären. Es wurden deshalb alle Substrate vollständig von Thiolen befreit und zwar mit folgenden Verfahren:

α / Acetyl-, Propionyl- und Butyryl-CoA lassen sich leicht durch Nachacylierung der Substratlösungen mit den entsprechenden Säureanhydriden von Thiolen befreien.

β / Bei den höheren Acyl-CoA-Verbindungen und beim Malonyl-CoA inkubierten wir die Substratlösungen mit überschüssigem Ellmans Reagens und reinigten das Reaktionsgemisch über Sephadex G 10. Das entstandene Thiophenolat wird, wahrscheinlich durch unspezifische Adsorption, stark zurückgehalten, während das Acyl-CoA im Ausschlußvolumen der Säule erscheint (Fig. 6).

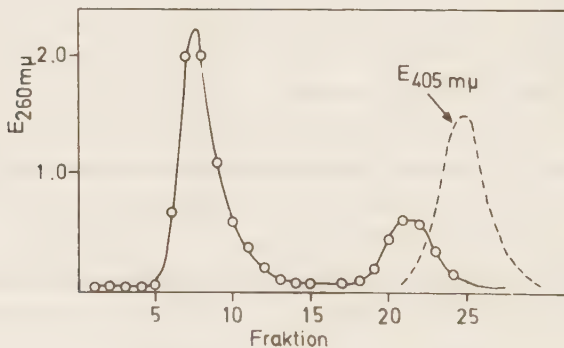
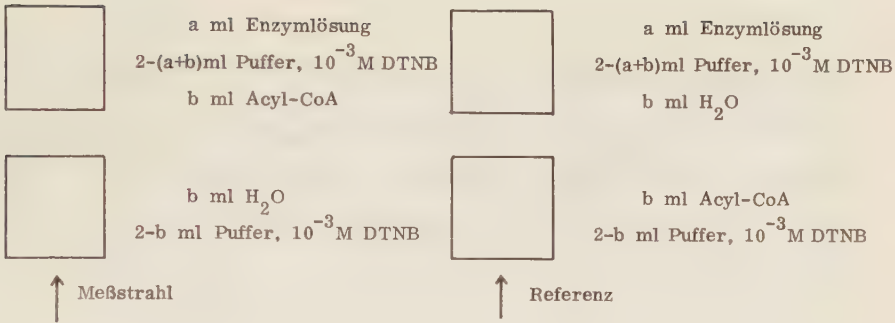


Fig. 6: Sephadex-G 10-Chromatographie zur Trennung von Acyl-CoA und Thiophenolat (aus DTNB).

Alle verwendeten Enzympräparate waren mindestens zwei Stunden mit 10^{-3} M Ellmans Reagens vorinkubiert. Nach dieser Zeit sind alle reaktiven Thiolgruppen blockiert und die zeitliche Extinktionszunahme ist gegenüber der Beladungsdauer völlig zu vernachlässigen (sie würde außerdem durch die Referenzküvetten kompensiert). Die Versuche wurden mit zwei Meß- und zwei Referenzküvetten ausgeführt, die nach folgendem allgemeinen Schema gefüllt waren:



c. Die Beladung mit Malonyl-CoA

Im Enzymkomplex existieren nach Untersuchungen von SCHWEIZER (15) und ZIEGENHORN (24) verschiedene Transferasen für den Malonyl- und Acetylrest. Das sollte auch direkt mit diesem Beladungsversuch zu demonstrieren sein: Nach dem ersten Extinktionssprung, der der Malonyl-Beladung entspricht gaben wir zusätzlich noch Acetyl-CoA zu und erwartungsgemäß steigt die Extinktion nochmals sprunghaft an, wie Fig. 7 zeigt. Ferner ist zu erkennen, daß für Malonyl-CoA nahezu keine Deacetylaseaktivität existiert. Die quantitative Auswertung dieser Versuche ist in Tab. 2 zusammengestellt. Der erste Extinktionssprung entspricht einer Beladung des Enzyms

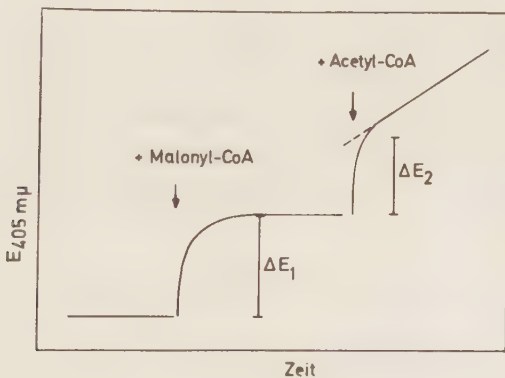


Fig. 7: Beladung DTNB-vorbehandelter Fettsäuresynthetase mit Malonyl-CoA und zusätzlich Acetyl-CoA. (Ausführung siehe Text).

mit etwa sechs Malonylresten, der zweite Sprung einer zusätzlichen Beladung von etwa vier Acetylresten.

Versuch	1. Substrat: Mal-CoA $\left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}} \right]$	Beladung	2. Substrat: Acetyl-CoA $\left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}} \right]$	Beladung	Enzymprotein mg/ml
1	0,5	5,1	0,5	3,5	3,9
2	0,5	4,5	0,3	4,1	2,5
3	0,2	4,6	0,3	4,2	2,5
4	0,3	6,4	0,5	4,0	3,0
5	0,5	5,7	0,3	4,1	3,5
6	0,5	6,2	0,3	3,9	3,9
7	0,5	6,0	0,5	4,0	3,5
Mittel		$5,5 \pm 0,3$		$4,0 \pm 0,1$	

Tabelle 2: Auswertung der Beladungsversuche.

d. Beladung mit Acetyl-CoA

Die Umkehrung der Substratzugabe, also Acetyl-CoA vor Malonyl-CoA, erbringt ein unerwartetes Ergebnis. Wie aus Tab. 3 zu entnehmen ist, entspricht der erste Extinktionssprung einer Beladung von rund acht Acetylresten. Bei anschließender Mal-CoA Zugabe ist keine weitere Extinktionsänderung feststellbar (Fig. 8). Das würde bedeuten, daß der Acetylrest auch die Malonyl-Acceptorstellen besetzen kann.

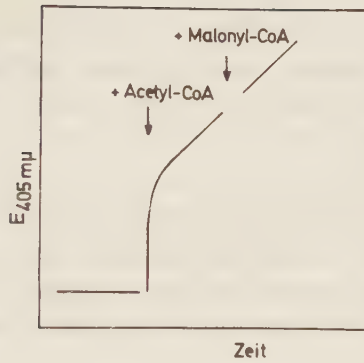


Fig. 8: Beladung DTNB-vorbehandelter Fettsäuresynthetase mit Acetyl-CoA und zusätzlich Malonyl-CoA (Ausführung siehe Text).

Versuch	1. Substrat Acetyl-CoA $\left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}} \right]$	Beladung	2. Substrat: Malonyl-CoA $\left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}} \right]$	Beladung	Enzymprotein mg/ml
1	0,5	7,3	0,5	0	3,0
2	0,5	7,5	0,3	0	2,9
3	0,3	8,0	0,5	0	2,2
4	0,6	7,7	0,4	0	2,2
5	0,2	8,1	0,5	0	3,5
6	0,5	8,5	0,3	0	3,5
Mittel	$7,8 \pm 0,2$				

Tabelle 3: Auswertung der Beladungsversuche.

3. Diskussion

Die mit der beschriebenen optischen Methode gewonnenen Beladungswerte könnten eine Fehlinterpretation der Meßdaten sein, wenn eine oder mehrere der folgenden Voraussetzungen zutreffen:

- a/ Jede Beladung des Enzyms setzt CoA frei. Dieses wird durch überschüssiges DTNB quantitativ abgefangen, die Beladungsreaktion wird damit zu einem vollständig und irreversibel verlaufenden Prozess. Möglicherweise können durch diesen starken "Zug" in Richtung Beladung unspezifische Beladungen parallel gehen.
- b/ Die zweistündige Vorinkubation des nativen Enzyms mit Ellmans Reagens erfaßt nur einen Teil der vorhandenen Enzymthiolgruppen (vgl. Fig. 3). Es ist denkbar, daß Enzymthiolgruppen, die für DTNB zwar nicht zugänglich sind, trotzdem als Acceptorgruppen für den Acetyl- und Malonylrest fungieren. Diese würden dann ebenfalls als "nichtthioesterartige" Acceptorstellen registriert. Ob diese Möglichkeit zutrifft, läßt sich mit radioaktiven Substraten kontrollieren: Wir beluden mit DTNB vorinkubiertes Enzym mit ^{14}C -Acetyl-CoA, und unterwarfen das beladene Protein einer zwölfstündigen Perameisensäureoxidation (25). Dabei gingen lediglich 6 % der ursprünglich gebundenen Radioaktivität verloren. ZIEGENHORN (26) fand jedoch mit einer etwas abweichenden Versuchsdurchführung (einstündige Vorinkubation des Enzyms, Perameisensäureoxidation erst nach Verdauung des Enzymproteins) einen etwa 20 %igen Radioaktivitätsverlust.
- c/ Löst die Zugabe eines Substrats eine konformative Veränderung des Multienzymkomplexes aus, so würden dabei sicher vorher abgeschirmte Thiolgruppen freigelegt werden und mit DTNB abreagieren. Notwendigerweise würde dieses Ereignis eine kovalente Beladung vortäuschen (und zwar jede freigelegte Thiolgruppe eine Bindungsstelle). Genau dieser Effekt ist auch der Grund, weshalb die optische Bestimmungsmethode nicht mit langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen (C_{14} bis C_{18}) durchgeführt werden kann. Hier nimmt die "Beladung" selbst im Enzymsättigungsbereich mit der

eingesetzten Menge Acyl-CoA stetig zu: Offensichtlich bewirkt hier der Detergens-effekt dieser Verbindungen konformative Veränderungen, die sogar zur Spaltung des Komplexes führen können.

Diese möglichen Interpretationsfehler der optischen Beladungsmessung lassen die Diskussion der erhaltenen Daten nur in Verbindung mit unabhängig gewonnenen Werten sinnvoll erscheinen.

IV. Ein Modell des Kettenabbruches in der Fettsäurebiosynthese und seine experimentelle Prüfung.

1. Vorbemerkungen

Die meisten in der Natur vorkommenden Fettsäuren haben eine Kettenlänge von sechzehn oder achtzehn Kohlenstoffatomen. Die Isolierung der fettsäuresynthetisierenden Enzymsysteme aus zahlreichen Organismen (4, 9, 27-30) zeigte, daß der Grund für die Häufigkeit der C_{16} - und C_{18} -Säuren in diesen Systemen selbst zu suchen ist; denn auch die in vitro Synthese der Fettsäuren ergibt Palmitin- und Stearinsäure bzw. ihre CoA-Derivate als Endprodukte (Fig. 9). In diesen Enzymsystemen steckt also die Information für einen spezifischen Kettenabbruch.

In Kapitel I wurde der Syntheseablauf am Multienzymkomplex beschrieben: Der Acylrest wird durch sich wiederholende Reaktioncyclen sukzessive mit C_2 -Einheiten aus Malonyl-CoA verlängert. Dieser geschilderte und experimentell gesicherte Reaktionsablauf erlaubt keine Erklärung des Syntheseabbruchs auf der Stufe der C_{16} - und C_{18} -Säure. Eine hohe Spezifität des transferierenden Teilenzym als Erklärung war naheliegend, doch Versuche von SCHWEIZER (15) zeigten, daß dieses Teilenzym in der Modellreaktion:



mit allen Acylresten von C_6 bis C_{16} vergleichbare Transferase-Aktivität besitzt. Der spezifische Kettenabbruch mußte also eine andere Ursache haben. LYNEN (31) versuchte erstmals diesen spezifischen Kettenabbruch mit der Annahme einer hydrophoben Umgebung der "zentralen" SH-Gruppe zu erklären. Dadurch würde die Verteilung des gesättigten Acylrestes zwischen "zentraler" und "peripherer" SH-Gruppe mit wachsender Kettenlänge immer mehr zugunsten der "zentralen" SH-Gruppe verschoben und damit eine Kettenverlängerung zunehmend erschwert. Dabei wird angenommen, daß die Übertragung auf CoA der Beladung der "zentralen" SH-Gruppe pro-

portional ist und ferner proportional der Beladung der "peripheren" SH-Gruppe Kondensation, d. h. Kettenverlängerung stattfindet. OESTERHELT (16) zeigte, daß mit diesen Annahmen das Auftreten von nur zwei Fettsäuren als Endprodukte zu verstehen ist.

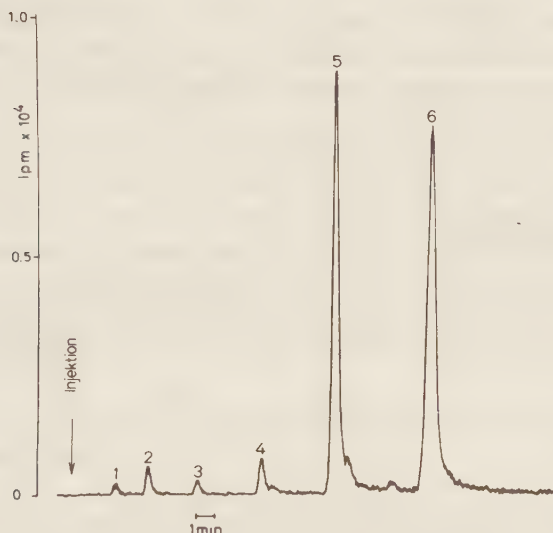


Fig. 9: Radiogaschromatogramm der Endprodukte im Standardansatz der Fettsäuresynthese (Ausführung siehe S. 95).

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) Caprylsäuremethylester; | 2) Caprinsäuremethylester; |
| 3) Laurinsäuremethylester; | 4) Myristinsäuremethylester; |
| 5) Palmitinsäuremethylester; | 6) Stearinsäuremethylester; |

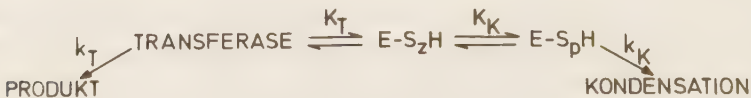
Die Forderung einer hydrophoben Umgebung der "zentralen" SH-Gruppe ist jedoch nicht mit dem Konzept einer Schwingarm-Funktion dieser Thiolgruppe und der damit verbundenen freien Beweglichkeit zwischen den aktiven Zentren der Teilenzyme zu vereinbaren. Von der Umgebung der "zentralen" SH-Gruppe kann dann nicht gesprochen werden. Ferner wird die Funktion des transferierenden Enzyms außer Acht gelassen. Es bietet sich deshalb an, das Modell des Kettenabbruchs zu erweitern,

nämlich den hydrophoben Bereich am transferierenden Teilenzym zu postulieren. Mit wachsender Kettenlänge würde dann die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Acylrestes an der Transferase steigen und damit die Chance übertragen zu werden und Produkt zu bilden.

Zusammen mit OESTERHELT versuchten wir dieses Konzept zur quantitativen Beschreibung des Kettenabbruchs heranzuziehen. Das Modell führt zu einer Reihe von Vorhersagen, die im folgenden zusammen mit ihrer experimentellen Prüfung aufgeführt werden.

2. Ableitung des Modells

Ausgangspunkt dieses Modells des Syntheseabbruchs ist die zweifache Reaktionsmöglichkeit jedes gesättigten Acylrestes an der "zentralen" SH-Gruppe:



Jeder gesättigte Acylrest an der "zentralen" SH-Gruppe kann in reversiblen Reaktionen auf die periphere SH-Gruppe übertragen werden: Nur dann kann er um eine weitere C_2 -Einheit aus Malonyl-CoA durch Kondensation verlängert werden. Oder aber er kann auf die Transferase und dann auf CoA übertragen werden und somit Produkt bilden. Die Gleichgewichtskonstanten K_T und K_K beschreiben die Verteilung der Acylreste zwischen zentraler SH-Gruppe und Transferase bzw. zentraler und peripherer SH-Gruppe. k_K und k_T sind die Geschwindigkeitskonstanten der praktisch irreversibel verlaufenden Reaktionen Kondensation und Transfer.

Die Wahrscheinlichkeit W für einen beliebigen Acylrest Produkt zu bilden, ist also einfach durch das Verhältnis von Kondensations- und Transfargeschwindigkeit gegeben:

$$(1) \quad W = \frac{V_T}{V_T + V_K} = \frac{1}{1 + \frac{V_K}{V_T}}$$

Die Geschwindigkeit der Übertragung ist dem Bruchteil α an Acylresten auf der Transferase proportional:

$$(2) \quad V_T \sim k_T \cdot \alpha$$

Entsprechend ist die Geschwindigkeit der Kondensation dem Bruchteil β an Acylresten auf der peripheren SH-Gruppe proportional. Außerdem muß für die Kondensationsgeschwindigkeit noch die relative Konzentration von Acetyl- und Malonyl-CoA berücksichtigt werden; denn beide Substrate konkurrieren um die zentrale SH-Gruppe, jedoch nur der Malonylrest auf dieser Thiolgruppe ermöglicht die Kondensation, so daß die maximale Kondensationsgeschwindigkeit noch um den Faktor $[\text{Mal-CoA}] / [\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]$ verkleinert wird:

$$(3) \quad V_K \sim k_K \cdot \beta \cdot \frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}$$

Die Kombination von (1), (2) und (3) ergibt unter Substitution von α und β durch K_T und K_K *) einen Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit der Produktbildung von der Form

$$(4) \quad W \sim \frac{1}{1 + \frac{k_K}{k_T} \cdot \frac{K_K}{K_T} \cdot \frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}}$$

Nach diesem Ausdruck hätten alle Acylreste die gleiche Wahrscheinlichkeit Produkt zu bilden. Das Modell des Syntheseabbruchs muß aber eine Änderung dieser Wahrscheinlichkeit mit wachsender Kettenlänge beschreiben. Das Enzymsystem kann ja verschieden lange Alkanketten unterscheiden. Ein solches Unterscheiden ist durch eine Wechselwirkung der Alkankette mit einer Art "Meßstrecke" am Enzymsystem

$$*) \quad K_T = \frac{\alpha}{1 - (\alpha + \beta)} \quad K_K = \frac{\beta}{(1 - (\alpha + \beta))}$$

möglich; jede durch Verlängerung hinzukommende Methylengruppe leistet einen Beitrag zur freien Energie dieser Wechselwirkung. Für unsere Betrachtung wollen wir - wie bereits erwähnt - einen hydrophoben Bereich an der Transferase als Meßstrecke annehmen, wie es in Fig. 10 skizziert ist. Neben dem eigentlichen aktiven Zentrum wäre am Enzym eine Art "zweite Bindungsstelle", eben der hydrophobe Bereich.

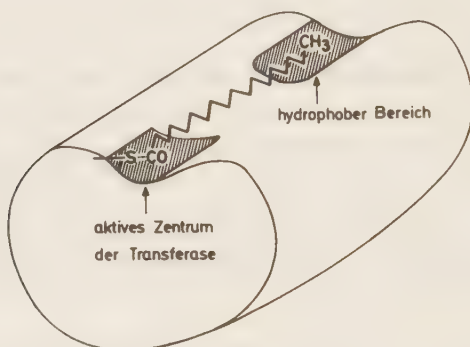


Fig. 10: Schematische Darstellung des postulierten hydrophoben Bereiches am transferierenden Teilenzym.

K_T , d. h. die Verteilung der Acylreste zwischen Transferase und zentraler SH-Gruppe hat damit nicht mehr als alle Acylreste den gleichen Wert, sondern ist jetzt eine Funktion der Kettenlänge des Acylrestes. Sobald zwischen dem hydrophoben Bereich und der wachsenden Alkylkette eine Wechselwirkung einsetzen kann, bewirkt jede hinzukommende Methylengruppe eine Veränderung der Gleichgewichtskonstanten K_T um einen Faktor $e^{-\frac{\Delta F}{RT}}$, wobei ΔF das Energieinkrement der hydrophoben Wechselwirkung pro Methylengruppe bedeutet. Stehen m Methylengruppen in Wechselwirkung mit der "Meßstrecke", so hat K_T den Wert

$$(5) \quad K_T = K_T^0 \cdot e^{-\frac{m \Delta F}{RT}}$$

wobei K_T^O die Gleichgewichtskonstante bei noch fehlender Wechselwirkung ist,

Mit Gleichung (5) in (4) ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit W_n der Produktbildung eines Acylrestes der Kettenlänge C_n Gleichung (6):

$$(6) \quad W_n = \frac{1}{1 + c \cdot e^{\frac{m \Delta F}{RT}}}$$

$$c \sim \frac{k_K}{k_T} \cdot \frac{K_K}{K_T^O} \cdot \frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}$$

Mit diesem Ausdruck lassen sich nun theoretische Produktverteilungen für beliebige Energieinkremente der Wechselwirkung berechnen [†]). Fig. 11 zeigt diese hypothetischen Produktverteilungen für eine angenommene Wechselwirkungsenergie pro Methylengruppe von $\Delta F = -1$ kcal/Mol (Kurve I) und $\Delta F = -0,4$ kcal/Mol (Kurve II). Mit einem Energieinkrement von -1 kcal/Mol treten tatsächlich nur noch zwei Säuren (C_n und C_{n+2}) als Endprodukte auf, während mit einem Inkrement von $\Delta F = -0,4$ kcal/Mol ein wesentlich breiteres Produktspektrum errechnet wird.

Übertragen auf die Fettsäuresynthetase wären also die Säuren C_n und C_{n+2} die Palmitin- bzw. die Stearinsäure. Das Maximum der Produktverteilung bildet im Beispiel (Kurve I) die Säure C_{n+1} die also der C_{17} oder Margarinsäure entsprechen würde. Als ungeradzahlige Säure kann diese jedoch unter den Normalbedingungen der Fettsäuresynthese nicht entstehen. Ersetzt man jedoch den Starter Acetyl-CoA durch Propionyl-CoA, so wird die homologe Reihe der ungeradzahligen Fettsäuren im Synthesecyclus durchlaufen. Hierbei sollte also entsprechend der theoretischen Kurve I Margarinsäure als nahezu einziges Endprodukt auftreten. Fig. 12 zeigt die experimentell gefundene Produktverteilung. Sie bestätigt die Vorhersage.

[†]) Aus der Wahrscheinlichkeit W in (6) errechnet sich der prozentuale Produktanteil (% P) der einzelnen Säuren wie folgt:

$$\begin{aligned} \% P_1 &= W_1 \cdot 100 \\ \% P_2 &= W_2 \cdot 100 \cdot (1 - W_1) \\ &\vdots \\ \% P_{n+1} &= W_{n+1} \cdot 100 \prod_{j=1}^n (1 - W_j) \end{aligned}$$

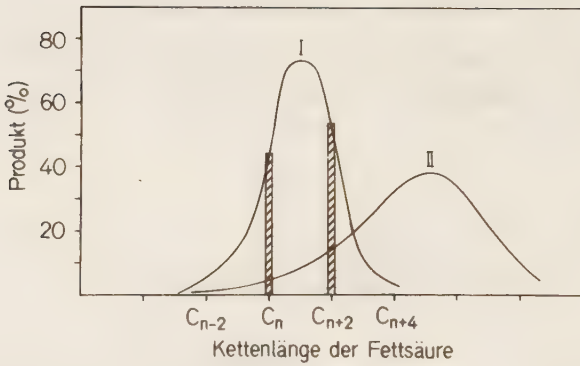


Fig. 11: Mit Gleichung (6) berechnete Endproduktverteilung für zwei Energieinkremente ΔF . Kurve I: $\Delta F = -1,0$ kcal pro Methylengruppe, Kurve II: $\Delta F = -0,4$ kcal pro Methylengruppe.

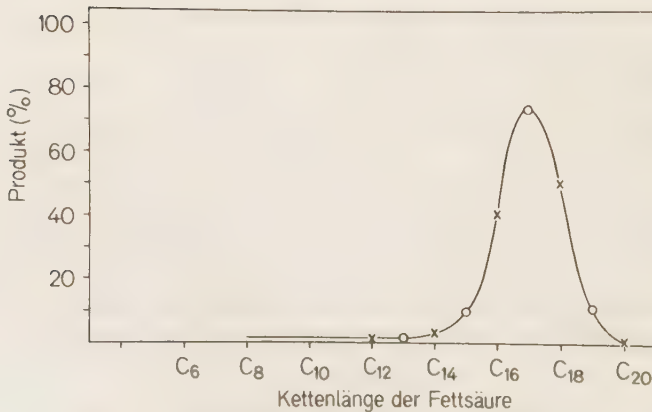


Fig. 12: Prozentuale Verteilung der Endprodukte der Fettsäuresynthese. X, Standardansatz (siehe S. 95); O, wie Standardansatz, jedoch statt Acetyl-CoA 0,25 μ Mol Propionyl-CoA als "Starter" der Synthese eingesetzt.

Die Lage des Produktmaximums der theoretischen Kurven wird durch den Wert von c (Gleichung (6)) und dem Beginn der Wechselwirkung zwischen wachsender Alkankette und Transferaseprotein bestimmt. Das Energieinkrement ΔF bestimmt die Form der Produktverteilungskurve.

In der Produktanalyse wird für die Säuren C_8 bis C_{12} eine konstante Häufigkeit von durchschnittlich 1,4 % des Gesamtproduktes gemessen. In diesem Kettenlängenbereich kann also die angenommene Wechselwirkung noch nicht bestehen. Sie setzt erst zwischen der C_{13} und C_{14} -Säure ein, wie man Fig. 12 entnimmt. Mit dem experimentellen Wert von je 1,4 % für C_8 bis C_{12} und dem Fehlen einer Wechselwirkung vereinfacht sich Gleichung (6) zu Gleichung (7):

$$(7) \quad W_{8-12} = \frac{1}{1 + c} \cong 0,014$$

Die Größe c für die Fettsäuresynthese unter Standardbedingungen ist damit zu $c = c_o \cong 70$ gegeben. Optimale Übereinstimmung von Experiment und Theorie ergibt sich mit einem Inkrement der Wechselwirkungsenergie pro Methylengruppe von $\Delta F = -0,9$ kcal/Mol. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den von Némethy und Scheraga (32) angegebenen Inkrementen für hydrophobe Wechselwirkungen.

Experimentell läßt sich das Modell weiter prüfen. Jede Änderung der Synthesebedingungen, die zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Kondensations- und Transfergeschwindigkeit führen, müssen eine jetzt berechenbare Änderung des Produktverhältnisses zur Folge haben. Gelingt es, die Kondensationsgeschwindigkeit relativ zur Transfergeschwindigkeit zu verlangsamen, so haben auch die kurzkettigen Acylreste noch vor dem Einsetzen der Wechselwirkung (ab C_{13}) die Möglichkeit übertragen zu werden. Es entstehen dann verstärkt auf Kosten der Stearinsäure die kürzerkettigen Fettsäuren. Umgekehrt wird bei einer relativen Geschwindigkeitsverschiebung zugunsten der Kondensation die Wahrscheinlichkeit für kurze Alkanketten - also noch vor dem Einsetzen der Wechselwirkung - übertragen zu werden praktisch Null. Das Produktspektrum verschiebt sich zu den langkettigen Säuren, besonders zur Stearinsäure hin. Auf der C_{18} -Stufe ist die Wechselwirkungsenergie und damit die Übertragungs-

wahrscheinlichkeit so groß, daß praktisch kein C_{18} -Acylrest mehr für eine weitere Kettenverlängerung am kondensierenden Enzym zur Verfügung steht.

3. Produktverschiebungen durch Variation der Acetyl- und Malonyl-CoA Konzentration.

LYNEN, HOPPER-KESSEL und EGGERER (9) beobachteten erstmals, daß die relative Substratkonzentration einen Einfluß auf die Produktverteilung hat. Dies läßt sich durch das Modell quantitativ erklären. Die Kondensationsgeschwindigkeit wird durch Variation der Acetyl- und Malonyl-CoA-Konzentration (wegen der bereits erwähnten Konkurrenz um die zentrale SH-Gruppe) mit dem Faktor $\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}$ gesteuert.

Im Experiment der Fig. 13 A wurde gegenüber den Standardbedingungen

$$\left(\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]} = \frac{2}{3}, \text{ s. exp. Teil} \right)$$

bei gleichbleibender Malonyl-CoA-Konzentration die Acetyl-CoA-Konzentration so stark erniedrigt, daß der Faktor $\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}$ praktisch den Wert 1 annimmt. Durch Vergleich mit Gleichung (6) ergibt sich für diese Bedingung ein neuer Wert von $c = 3/2 \cdot c_0 = 3/2 \cdot 70$. Eine kleine und konstante Acetyl-CoA Konzentration wird dadurch erreicht, daß man dem Inkubationsansatz eine limitierende Menge Malonyl-CoA-Decarboxylase (s. exp. Teil) zusetzt, die das notwendige Acetyl-CoA nach



entstehen läßt.

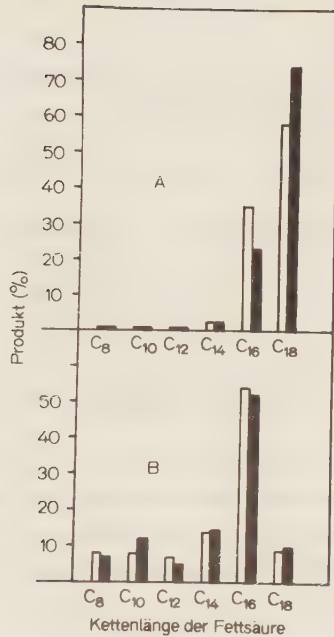


Fig. 13: Verschiebung der Endproduktverteilung durch verschiedene Verhältnisse von $[\text{Mal-CoA}] / [\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]$
A: $[\text{Mal-CoA}] / [\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}] \approx 1$; wie Standardansatz (siehe S.95), jedoch ohne Acetyl-CoA; zusätzlich 2,6 mE Malonyl-CoA-Decarboxylase (siehe S.96)
weiße Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $C = 3/2 \cdot 70$;
schwarze Balken: experimentell gefunden,

B: $[\text{Mal-CoA}] / [\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}] = 1/10$; wie Standardansatz, jedoch 4,5 $\mu\text{Mol } 1\text{-}^{14}\text{C-Acetyl-CoA}$ (6 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$)
weiße Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $c = 1/6, 5 \cdot 70$;
schwarze Balken: experimentell gefunden.

Die Berechnung der zu erwartenden Produktverteilung zeigt, daß Stearinsäure Hauptprodukt der Synthese werden sollte. Dies wird im Experiment gefunden (Fig. 13 A).

Umgekehrt sollte die Erhöhung der Acetyl-CoA-Konzentration bei wiederum gleichbleibender Malonyl-CoA-Konzentration auf den Wert

$$\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]} = \frac{1}{10} \quad (\text{d. h. } c = \frac{1}{6,5} \cdot c_0)$$

die Synthese kürzerkettiger Säuren begünstigen. Fig. 13 B stellt Experiment und Berechnung gegenüber.

4. Die Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel

Sinkt die Malonyl-CoA-Konzentration unter den Sättigungswert für Synthetase, so wird die Kondensationsgeschwindigkeit beliebig verlangsamt. Mit Acetyl-CoA als alleinigem Substrat im Inkubationsansatz kann die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese und damit die der Kondensation (siehe S. 33) durch definierte Mengen Acetyl-CoA-Carboxylase gesteuert werden.

Wir haben Versuchsbedingungen gewählt, unter denen die Fettsäuresynthesegeschwindigkeit (und damit die Kondensationsgeschwindigkeit) nur 1/56 des maximal möglichen Wertes erreichte. Das bedeutet, daß sich das Verhältnis von Kondensations- und Transfargeschwindigkeit um den Faktor 1/56 verändert, durch Vergleich von Gleichung (6) und (1) ergibt sich für diese Bedingungen ein Wert $c = 1/56 \cdot c_0$. Die Synthese kurzkettiger Fettsäuren ist im erwarteten Ausmaß die Folge, wie Fig. 14 zeigt.

Es tritt keine Stearinsäure und fast keine Palmitinsäure mehr auf. Übertragen auf die Fettsäuresynthese in vivo kommt somit der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität ein Einfluß auf die Kettenlänge der synthetisierten Fettsäuren zu. Eine niedrige Aktivität des Enzyms könnte ein spezifisch kurzkettige Fettsäuren produzierendes Enzymsystem vortäuschen. Ein Zusammenhang zwischen Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität und Ket-

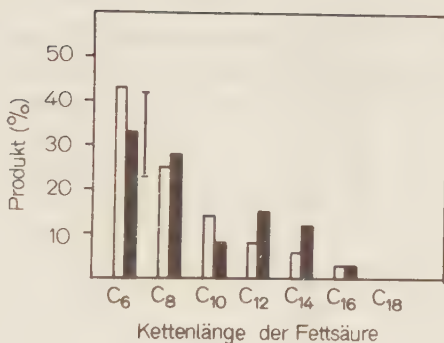


Fig. 14: Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel. Die Synthesegeschwindigkeit von Malonyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase betrug $1/56$ des maximal möglichen Verbrauches durch die eingesetzte FSS (siehe S. 96)

weiße Balken: berechnet mit Gleichung (6) für

$$c = 1/56 \cdot 70;$$

schwarze Balken: experimentell gefunden.

tenlänge der synthetisierten Fettsäuren wurde auch in Rohextrakten aus laktierenden Milchdrüsen von SMITH und DILS, sowie von BARTHLEY, ABRAHAM und CHAIKOFF gefunden (33, 34).

5. Beeinflussung des Geschwindigkeitsverhältnisses von Kondensation und Transfer durch Guanidin·HCl.

Guanidin·HCl verursacht im Konzentrationsbereich 0 bis 0,8 M eine zunehmende Ver-

langsamung der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex.

Fig. 15 zeigt diese Abnahme für die Gesamtaktivität sowie für die kondensierende und transferierende Teilaktivität. Bei einer Guanidin-HCl-Konzentration von 0,6 M im Inkubationsansatz ist das relative Geschwindigkeitsverhältnis der beiden Teilenzyme auf 1/6 des ursprünglichen Wertes gesunken. Unter diesen Bedingungen ergibt sich also für c ein neuer Wert von $c = 1/6 \cdot c_0$. Fig. 16 B vergleicht die so berechnete mit

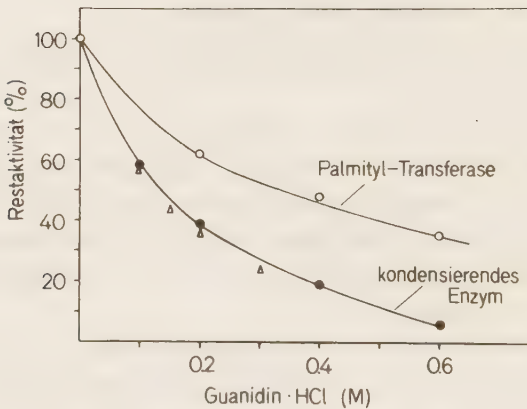


Fig. 15: Hemmung einzelner Enzymaktivitäten durch Guanidin · HCl.
(Ausführung siehe S. 97) Δ , Gesamtaktivität.

der für diese Bedingungen experimentell gefundenen Produktverteilung. Gegenüber der Normalverteilung (Fig. 16 A) verschiebt sich das Palmitin-/Stearinsäureverhältnis erheblich zugunsten der Palmitinsäure, ferner treten kürzerkettige Fettsäuren verstärkt auf,

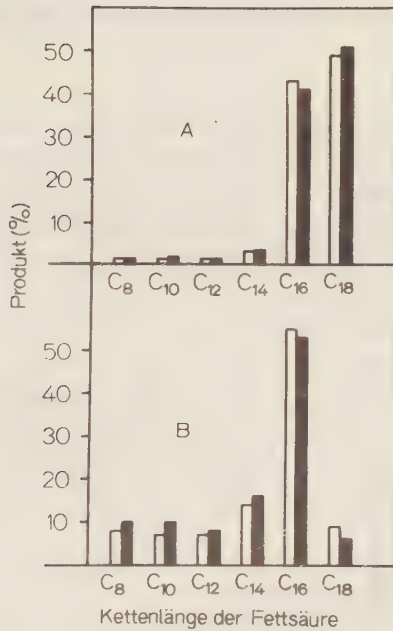


Fig. 16: Verschiebung der Endproduktverteilung durch Veränderung der Geschwindigkeitsverhältnisse von Kondensations- und Übertragungsreaktion.

A: Normalverteilung des Standardansatzes (siehe S. 95)
weiße Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $c = 70$;
schwarze Balken: experimentell gefunden

B: Produktverteilung des Standardansatzes in Gegenwart von 0,6 M Guanidin · HCl
weiße Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $c = 1/6 \cdot 70$;
schwarze Balken: experimentell gefunden.

Eine sehr viel stärkere Zunahme des Anteils kurzkettiger Fettsäuren sollte die Kombination der eben beschriebenen Versuchsbedingungen mit einer zusätzlichen Verlangsamung der Kondensationsgeschwindigkeit über den Faktor $\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Ac-CoA} + \text{Mal-CoA}]}$ erbringen.

Im dazugehörigen Experiment werden also in 0,6 M Guanidin · HCl mit einem $\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Ac-CoA} + \text{Mal-CoA}]}$ -Verhältnis von 1/10 Fettsäuren durch die Fettsäuresynthetase synthetisiert ($c = 1/6 \cdot 1/6,5 \cdot c_0$). Nur mehr geringe Mengen Palmitin- und keine Stearinsäure sollten in den Endprodukten auftreten, Fig. 17 B zeigt die experimentelle Übereinstimmung mit der Erwartung.

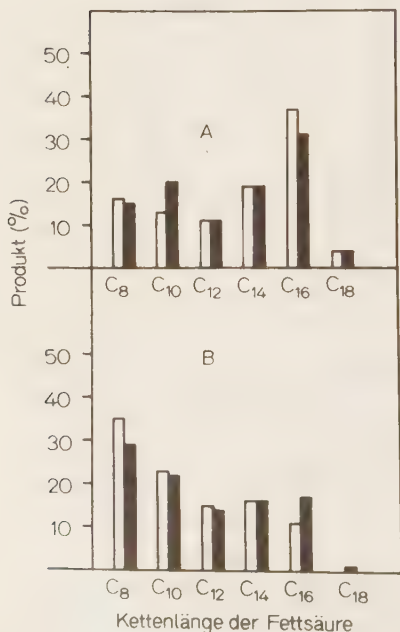


Fig. 17: Verschiebung der Endproduktverteilung durch verschiedene Verhältnisse von $\frac{[\text{Mal-CoA}]}{[\text{Mal-CoA} + \text{Ac-CoA}]}$ in Gegenwart von Guanidin · HCl.

A: Standardansatz (s. S. 95) wie folgt variiert: 4,5 $\mu\text{Mol } ^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (6 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$), ferner 0,3 M Guanidin · HCl.

Weißer Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $c = 1/2 \cdot 1/6,5 \cdot 70$;
 schwarze Balken: experimentell gefunden.
 B: wie A, nur in 0,6 M Guanidin · HCl.
 weißer Balken: berechnet mit Gleichung (6) für $c = 1/6 \cdot 1/6,5 \cdot 70$;
 schwarze Balken: experimentell gefunden.

6. β -Ketoacyl-CoA- und α, β -ungesättigte Acyl-CoA-Verbindungen als Endprodukte der Fettsäuresynthese.

a. Vorbemerkungen

Das Modell kann das alleinige Auftreten von Palmitin- und Stearinsäure unter Normalbedingungen der Fettsäurebiosynthese erklären. Warum jedoch nur die gesättigten C_{16} - und C_{18} -Säuren auftreten und nicht auch ihre β -Keto-, β -Hydroxy-, und α, β -ungesättigten Vorstufen ist durch das Modell noch nicht erklärt. Frühere Versuche hatten gezeigt, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäurebiosynthese am Multienzymkomplex die Kondensationsreaktion ist (16). Das hat zur Folge, daß der gesättigte Acylrest die längste Lebensdauer aller auftretenden Zwischenstufen besitzt. Sobald die Kondensation zwischen gesättigtem Acylrest und dem Malonylrest erfolgt ist, wird der entstandene β -Ketoacylrest so schnell wieder zum gesättigten Acylrest umgewandelt, daß eine Übertragung auf CoA, d. h. Produktbildung der Zwischenprodukte gar nicht konkurrieren kann.

Diese Interpretation kommt ohne die Annahme einer absoluten Spezifität der Transferase für gesättigte Acylreste aus. Wenn sie richtig ist, muß es möglich sein, auch die β -Keto-, β -Hydroxy- oder α, β -ungesättigten Acyl-CoA-Verbindungen als Endprodukte entstehen zu lassen: Und zwar immer dann, wenn eine der entsprechenden Teilaktivitäten verlangsamt werden kann und damit ein Zwischenprodukt eine längere Lebensdauer erreicht.

Diese Forderung ist für die erste Reduktion durch Ersatz des "natürlichen" Coenzyms NADPH durch NADH zu verwirklichen. Außerdem können beide Reduktionsschritte, sowohl erste wie zweite Reduktion durch starke Erniedrigung der NADPH-Konzentration beliebig verlangsamt werden. Sobald nämlich die NADPH-Konzentration unter den Wert der Enzymsättigung fällt, werden diese Reduktionsschritte zunehmend verlangsamt und schließlich geschwindigkeitsbestimmend. Es sollten dann auch die C_{16} - und C_{18} - β -Keto- und die C_{16} und C_{18} - α, β -ungesättigten Acyl-CoA-Derivate als Endprodukte auftreten.

b. Die Fettsäuresynthese mit NADH als Coenzym.

α . Kinetik und Endproduktanalyse

LYNEN, EGGERER und HOPPER-KESSEL (9) beobachteten, daß sich beim Ersatz des Coenzym NADPH durch NADH die Fettsäuresynthesegeschwindigkeit verlangsamt. Fig. 18 zeigt die Abhängigkeit der Synthesegeschwindigkeiten von der Konzentration für beide Coenzyme. NADH hat eine geringere Affinität zum Enzym und erreicht auch

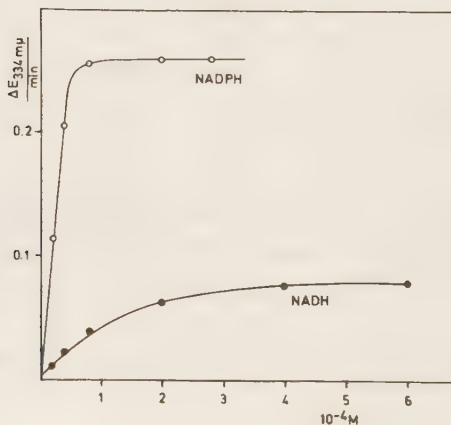


Fig. 18: Abhängigkeit der Fettsäuresynthesegeschwindigkeit von der Coenzym-Konzentration (NADPH bzw. NADH).

unter Sättigungsbedingungen nur 1/3 der Maximalgeschwindigkeit, die mit NADPH als Coenzym erreicht wird. Untersucht man die Teilaktivität der 1. Reduktion mit dem Modellsubstrat S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin mit den beiden Pyridinnucleotiden,

so ergibt sich mit NADH eine 50 - 100 mal kleinere Aktivität. Offensichtlich wird also diese Teilaktivität so stark verlangsamt, daß sie zum geschwindigkeitsbestimmen- den Schritt unter diesen Bedingungen wird.

Entsprechend der Modellvorstellung sollten also bei der Fettsäuresynthese mit NADH als Coenzym zusätzlich die C_{16} - und C_{18} - β -Keto-acyl-CoA-Verbindungen als End- produkte auftreten.

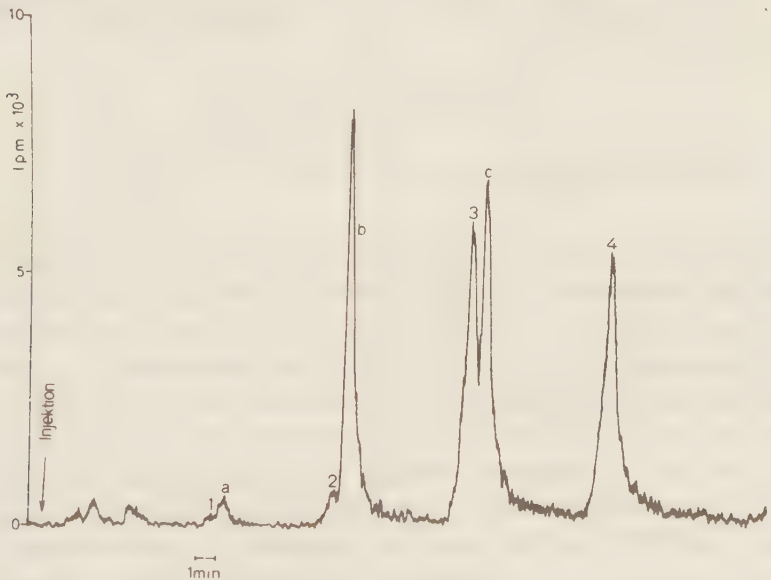
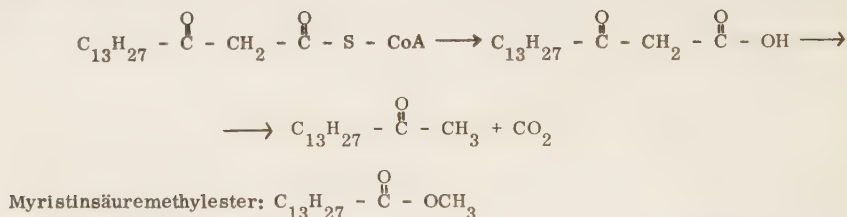


Fig. 19: Radiogaschromatogramm der Endprodukte der Fettsäuresynthese mit NADH statt NADPH als Coenzym. Wie Standardansatz (siehe S. 95), jedoch mit 1,2 μ Mol NADH und 1,3 μ Mol Malonyl-CoA.

- 1) Laurinsäuremethylester; 2) Myristinsäuremethylester;
- 3) Palmitinsäuremethylester; 4) Stearinsäuremethylester;
- a) Methylundecylketon; b) Methyltridecylketon;
- c) Methylpentadecylketon.

Fig. 19 zeigt die radiogaschromatographische Endproduktanalyse eines solchen Inkubationsansatzes. Es treten im wesentlichen zwei neue Radioaktivitätsgipfel neben der Palmitin- und Stearinsäure auf. Der Inkubationsansatz wird üblicherweise durch milde alkalische Verseifung zur Überführung der Acyl-CoA-Verbindungen in die freien Carbonsäuren aufgearbeitet. Bei dieser Operation sollten die erwarteten β -Ketoacyl-CoA-Verbindungen zunächst zu den freien β -Ketosäuren verseifen und diese dann die Ketonspaltung erleiden:



Ein Vergleich der Struktur des β -Ketopalmitinsäureabkömmlings Methyltridecylketon mit dem Myristinsäuremethylester (die Fettsäuren werden als Methylester gaschromatographisch analysiert, s. exp. Teil) läßt für beide Substanzen ganz ähnliches gaschromatographisches Verhalten, d. h. ganz ähnliche Retentionszeiten, erwarten. Mit anderen Worten: Der β -Ketostearinsäureabkömmling Methylpentadecylketon sollte mit dem Palmitinsäuremethylester, der β -Ketopalmitinsäureabkömmling Methyltridecylketon sollte mit dem Myristinsäuremethylester im Gaschromatogramm erscheinen. Genau an diesen Stellen tauchen die neuen Gipfel b und c auf, während an der Stelle des Stearinsäuremethylesters kein neuer Gipfel erscheint; dieser müßte ein β -Ketoarachinsäureabkömmling sein, die praktisch nicht mehr synthetisiert wird. Im folgenden sollen die Versuche beschrieben werden, die die Identität des

Gipfels a	mit Methylundecylketon
Gipfels b	mit Methyltridecylketon
Gipfels c	mit Methylpentadecylketon

beweisen.

3. Charakterisierung der unbekannten Endprodukte.

Löslichkeitsverhalten

Ein Inkubationsansatz mit NADH als Reduktionsmittel wurde nach Verbrauch von 0,3 μ Mol NADH mit 5 %iger methanolischer KOH gestoppt, 30 Minuten bei 70°C gehalten und dann dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Fettsäuren sind aus diesem alkalischen

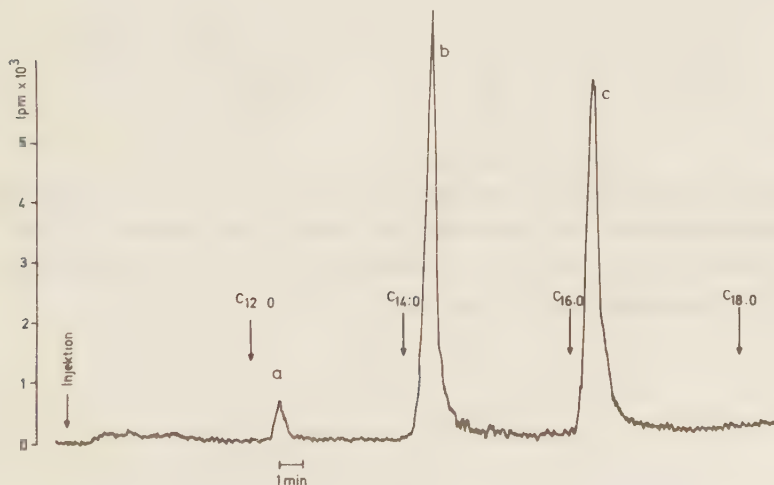


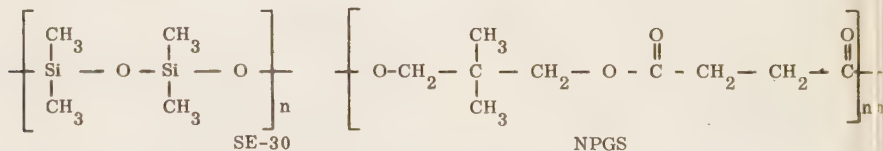
Fig. 20: Radiogaschromatogramm der aus alkalischem Medium extrahierbaren Endprodukte (Einzelheiten siehe Text).

Medium nicht extrahierbar. Der Ätherextrakt wurde eingeeengt und ohne Veresterung direkt der gaschromatographischen Analyse unterworfen. Das Ergebnis zeigt Fig. 20. Es erscheinen nur die Radioaktivitätsgipfel a, b und c der Fig. 19. Die eingezeichneten Pfeile markieren die Retentionszeiten von Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stea-

rinsäuremethylester für die gewählten Bedingungen. Das Experiment beweist, daß es sich bei den Gipfeln a, b und c um keine Carbonsäuren handelt.

Gaschromatographisches Verhalten.

Zur weiteren Charakterisierung wurde zunächst die Identität des intensivsten Gipfels b mit authentischem Methyltridecylketon geprüft. Zwei extreme stationäre Phasen dienten bei der gaschromatographischen Analyse: Die unpolare Phase SE-30 und die stark polare Phase NPGS.



Auf NPGS-Säulen erscheint der Myristinsäuremethylestervor dem Methyltridecylketon im Gaschromatogramm, die SE-30-Säule kehrt dagegen diese Reihenfolge um. Wie Fig. 21 und 22 zeigt, verhält sich Radioaktivitätsgipfel b auf beiden Säulen völlig identisch zum authentischen Methyltridecylketon.

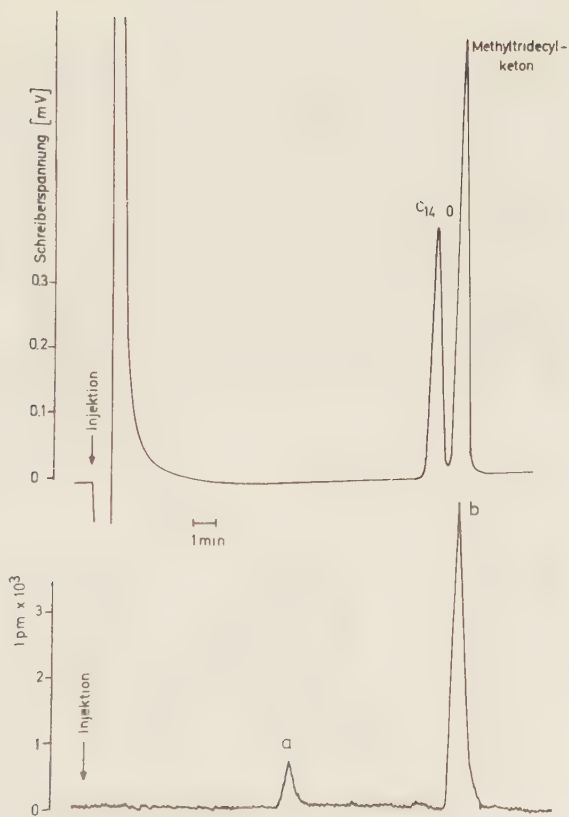


Fig. 21: Gaschromatographischer Vergleich des radioaktiven Materials des Gipfels b (Fig. 19) mit authentischem Methyltridecylketon auf einer NPGS-Säule.

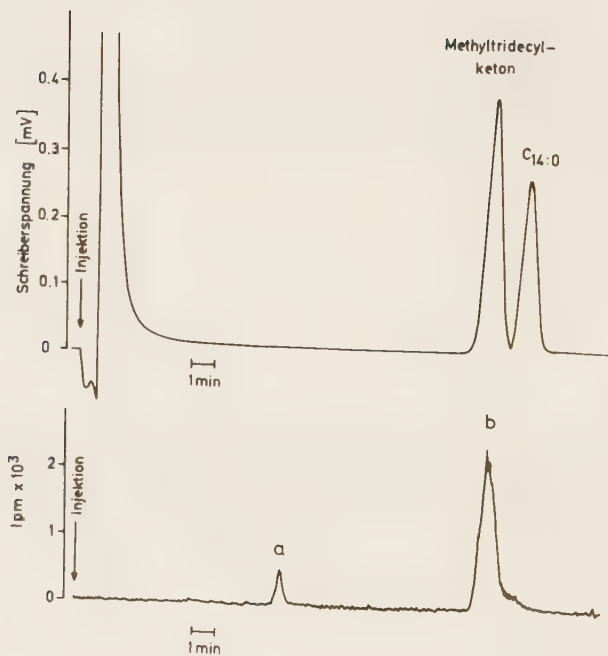


Fig. 22: Gaschromatographischer Vergleich des radioaktiven Materials des Gipfels b (Fig. 19) mit authentischem Methyltridecylketon auf einer SE-30-Säule.

Semicarbazon und 2,4-Dinitrophenylhydrazon.

Einen weiteren Identitätsbeweis des Gipfels b mit Methyltridecylketon erbrachte die Umsetzung zum Semicarbazon und 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Hierzu wurde der Gipfel b eines NADH-Inkubationsansatzes mit der in Fig. 23 schematisch wiedergegebenen Auffangvorrichtung gaschromatographisch isoliert. Dieses, mit Essigester gefüllte Auffangrohr wurde im Augenblick des Erscheinens des Methyltridecylketon-(Träger)-Gipfels im Massenschreiber am Detektorausgang angebracht. Nach Zusatz von 20 mg Methyltridecylketon zu der so erhaltenen Fraktion erfolgte die Umsetzung zum Semicarbazon. Dieses wurde nacheinander aus vier verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Tab. 4 zeigt, daß die spezifische Radioaktivität auch nach der vierten Kristallisation konstant blieb.

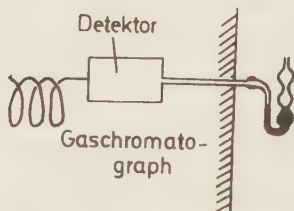


Fig. 23: Schematische Darstellung der Auffangvorrichtung zur gaschromatographischen Isolierung der Syntheseendprodukte.

Mit einer analogen Versuchsdurchführung setzten wir das radioaktive Material des Gipfels b mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin um. Das Reaktionsgemisch wurde auf Kieselgel G mit Petroläther/Benzol (1 : 3) chromatographiert. Das Dinitrophenylhydrazon des authentischen Methyltridecylketons ergibt im Dünnschichtchromatogramm zwei Flecken mit einem Intensitätsverhältnis von etwa 3 : 1, vermutlich bedingt durch eis-

trans-Isomerie des Hydrazons. Die Radioaktivität des Gipfels b läuft exakt mit dem Träger und zeigt die gleiche Aufspaltung (Fig. 24).

	Lös. mittel	IpM/mg
1. Krist.	$\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	6100
2. Krist.	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	5760
3. Krist.	Dioxan	6000
4. Krist.	Essigester	5990

Tabelle 4: Umkristallisation des Semicarbazons des Methyltridecylketons. Insgesamt eingesetzte Radioaktivität des Gipfels b: 150 000 IpM.

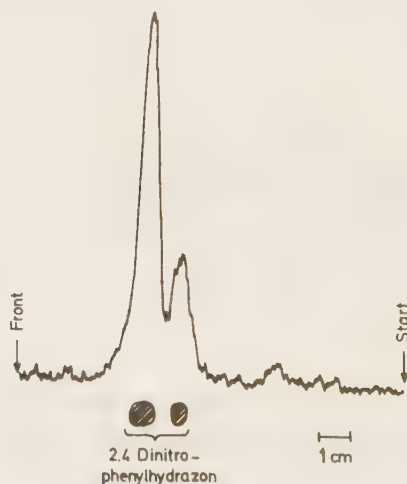


Fig. 24: Charakterisierung des radioaktiven Materials des Gipfels b der Fig. 19 durch Überführung in ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon: Dünnschichtchromatographischer Vergleich mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Methylundecylketons (Ausführung siehe S. 98).

Weitere Derivate.

Mit den oben vorgestellten Versuchen war die Identität des Gipfels b mit Methyltridecylketon bewiesen. Der Vollständigkeit halber wurde noch ein Versuch durchgeführt, der auch die Identität der Gipfel a und c mit den entsprechenden Ketonen beweisen sollte.

Ein Inkubationsansatz mit NADH als Coenzym wurde nach Verseifung mit den Trägern Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure sowie mit Methylundecyl- und Methyltridecylketon versetzt und ein Aliquot nach Aufarbeitung und Veresterung gaschromatographisch analysiert. (Fig. 25). Der Restansatz wurde mit Kaliumboranat reduziert. Dabei werden die Ketone zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt, die Fettsäuremethylester bleiben unverändert. Nach Zusatz von authentischem 2-Heptadecanol, dem Reduktionsprodukt des Methylpentadecylketons wurde der Ansatz mit Diazomethan unter Bortrifluorid-Katalyse methyliert, um die Alkohole in ihre Methyläther zu überführen. Diese haben auf der verwendeten NPGS-Säule wesentlich kürzere Retentionszeiten als die entsprechenden Ketone (Fig. 25). Die Radioaktivitäten der vermuteten Ketongipfel a, b und c verhalten sich bei diesen Operationen identisch den Massengipfeln der zugesetzten Trägerketone bzw. ihren Derivaten. Alle anderen Radioaktivitätsgipfel zeigen dagegen keine Änderung ihrer Retentionszeiten.



Fig. 25: Identifizierung der Methylketone durch Radiogaschromatographie ihrer chemischen Umwandlungsprodukte: Oberstes Diagramm: Massendiagramm der authentischen Träger. Darunter das Massendiagramm nach Reduktion und Methylierung (siehe Text). Die unteren beiden Diagramme zeigen das Verhalten der Radioaktivitäten bei dieser Umsetzung. 2) 3) 4) und a) b) wie in Fig. 19, a'), b') und c') Methylätherderivate des Methylundecyl-, Methyltridecyl- und Methylpentadecylketons.

c. Die Fettsäuresynthese mit limitierenden Mengen NADPH.

α . Endproduktanalyse

Ein anderes Experiment sollte ebenfalls zu einer "Modulation" des Endproduktmusters in der in vitro Fettsäurebiosynthese führen, wie bereits auf Seite 33 erwähnt wurde. Mit limitierender NADPH-Konzentration im Inkubationsansatz werden beide Reduktionsschritte (1. und 2. Reduktion) verlangsamt und entsprechend der Modellvorstellung sollten dann neben den gesättigten Acyl-CoA-Verbindungen zusätzlich die β -Keto- und α, β -ungesättigten Acyl-CoA-Derivate als Endprodukte auftreten. Im Experiment (Fig. 26) wurde die Fettsäuresynthetase-reaktion mit einem NADPH-erzeugendem System gekoppelt. Der Inkubationsansatz enthielt an Stelle von NADPH NADP^+ sowie Glucose-6-phosphat und limitierende Mengen Glucose-6-phosphatdehydrogenase, so daß die NADPH-Synthese etwa neunmal langsamer war als der Maximalverbrauch durch die eingesetzte Fettsäuresynthetase. Fig. 26 zeigt die Erwartung bestätigt: Wieder treten neben den gesättigten Fettsäuren die Methylketone auf und zusätzlich ein weiterer intensiver Radioaktivitätsgipfel β .

Interessanterweise tauchen die Verbindungen der C_{16} -Kettenlänge verstärkt auf Kosten der C_{18} -Verbindungen auf, obwohl unter Standardbedingungen (bis auf die NADPH-Konzentration) gearbeitet wurde (unter denen C_{16} und C_{18} etwa gleiche Häufigkeit zeigen, s. Fig. 9). Dies ist qualitativ zu erwarten: Auf der C_{16} -Stufe ist erstmals eine Übertragung gut möglich. Jetzt hat aber nicht nur der gesättigte Acylrest eine Chance Produkt zu bilden, sondern gleich drei C_{16} -Derivate: Die β -Keto-, die α, β -ungesättigte und die gesättigte Acylverbindung: Notwendigerweise fällt damit die Wahrscheinlichkeit für einen Acylrest die C_{16} -Stufe zu "überleben" und zur C_{18} -Verbindung verlängert zu werden. Diese Überlegung legt nahe, daß auch Gipfel β die C_{16} - α, β -ungesättigte Säure ist und nicht ein C_{18} -Derivat. Im folgenden werden die Versuche zur Identifizierung dieser Verbindung beschrieben.

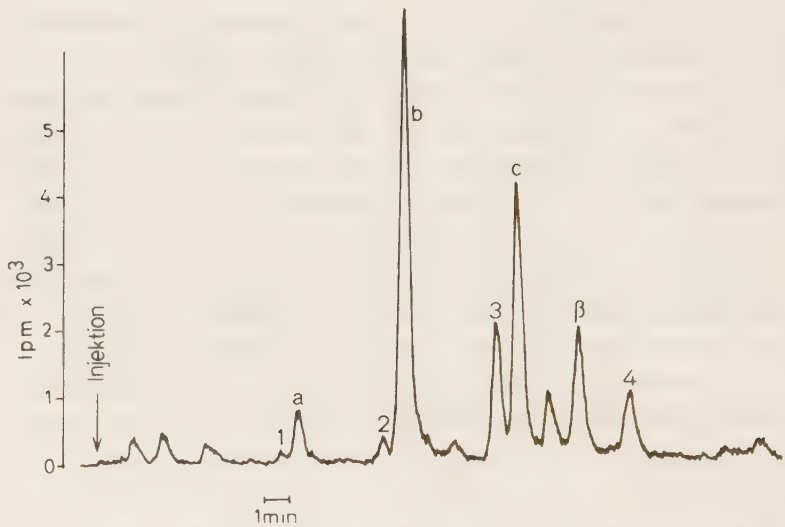


Fig. 26: Radiogaschromatogramm der Endprodukte in der Fettsäuresynthese limitiert durch die NADPH-Konzentration. Standardansatz (siehe S.95) ohne NADPH, jedoch mit 140 mE Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Ausführung siehe S. 99).
1) Laurinsäuremethylester; 2) Myristinsäuremethylester; 3) Palmitinsäuremethylester; 4) Stearinsäuremethylester; a) Methylundecylketon; b) Methyltridecylketon; c) Methylpentadecylketon; β) 2-Hexadecensäuremethylester.

β. Charakterisierung der unbekannten Endprodukte.

Gaschromatographisches Verhalten des Gipfels β.

Wir verglichen das gaschromatographische Verhalten des Radioaktivitätsgipfels β mit authentischer trans-2-Hexadecensäure auf den stationären Phasen NPGS und SE-30. Auf der polaren NPGS-Säule hat die α, β -ungesättigte C_{16} -Säure entsprechend ihrer erhöhten Polarität gegenüber Palmitinsäure eine verlängerte Retentionszeit, die der Stearinsäure nahekommmt. Die nach lipophilen Eigenschaften trennende SE-30 Phase unterscheidet dagegen weniger stark zwischen ungesättigter und gesättigter Säure, so daß hier Palmitinsäure und 2-Hexadecensäure ähnliche Retentionszeiten haben.

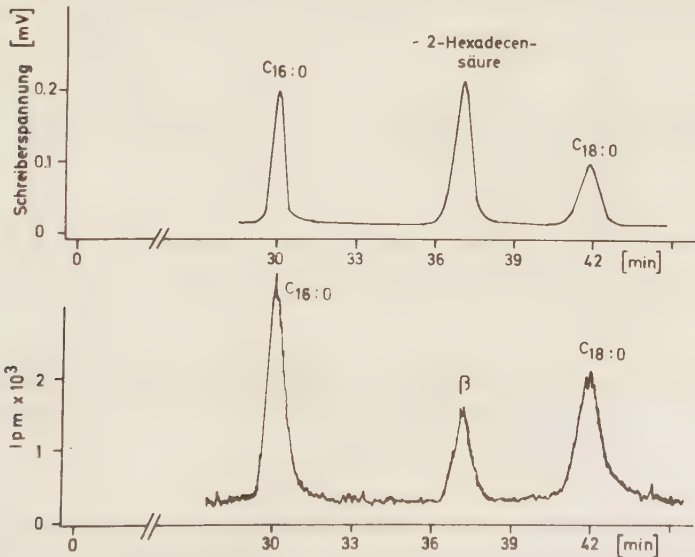


Fig. 27: Gaschromatographischer Vergleich des radioaktiven Materials des Gipfels β (Fig. 26) mit authentischer 2-Hexadecensäure auf einer NPGS-Säule.

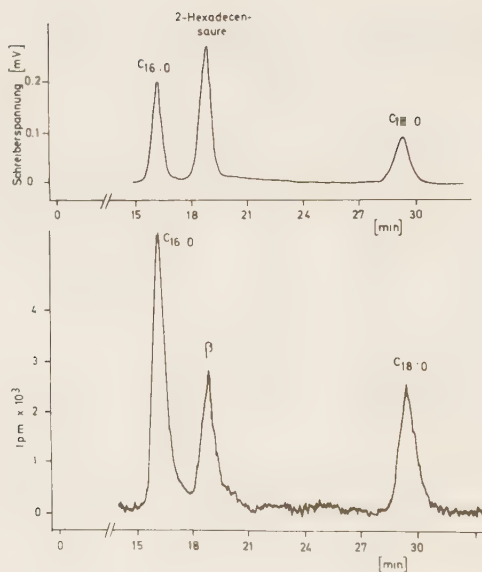


Fig. 28: Gaschromatographischer Vergleich des radioaktiven Materials des Gipfels β (Fig. 26) mit authentischer 2-Hexadecensäure auf einer SE-30-Säule.

Das Träger-Massendiagramm und die Radioaktivitätsverteilung eines Inkubationsansatzes mit der vermuteten 2-Hexadecensäure für die beiden Säulentypen sind in Fig. 27 und 28 wiedergegeben, Gipfel β verhält sich wie der zugesetzte Träger 2-Hexadecensäure.

Chemischer Identitätsbeweis.

Um die Identität des Materials im Gipfel β mit 2-Hexadecensäure durch eine chemische Abbaureaktion zu beweisen, isolierten wir dieses Material mit der bereits erwähnten gaschromatographischen Methode (siehe S.41). Ein Aliquot der so isolierten Radioaktivität wurde zusammen mit 2-Hexadecensäure als Träger rechromatographiert. Fig. 29 zeigt die saubere Abtrennung der Substanz des Gipfels β von allen anderen Endprodukten. Der Restansatz wurde einer Oxidation mit Kaliumpermanganat in Aceton unterworfen (35). Nach dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz angesäuert, mit Petroläther extrahiert und nach Veresterung erneut gaschromatographisch analysiert. Das Ergebnis zeigt Fig. 30: Der Träger ist weitgehend nach Gleichung (8) zur Myristinsäure abgebaut worden. Die Radioaktivität findet sich nach dieser Oxidation ebenfalls an der Stelle des Myristinsäuremethylesters, womit die Identität der Substanz des Gipfels β mit 2-Hexadecensäure bewiesen ist.

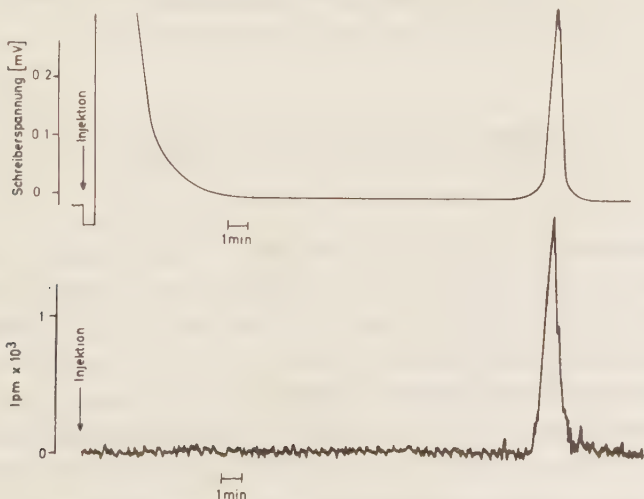


Fig. 29: Rechromatographie des gaschromatographisch isolierten radioaktiven Materials des Gipfels β der Fig. 26. Oben Massendiagramm des Trägers 2-Hexadecensäuremethylester.

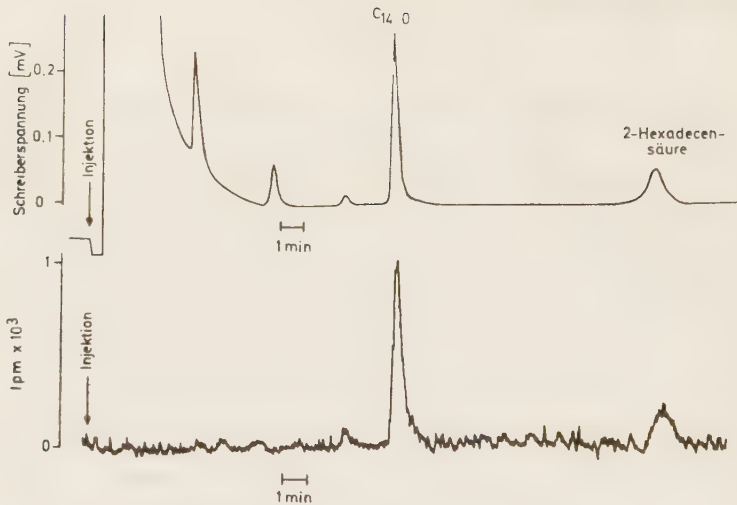


Fig. 30: Radiogaschromatogramm des radioaktiven Materials des Gipfels β der Fig. 26 nach oxidativem Abbau mit KMnO_4 (Ausführung siehe S. 99); oben Massendiagramm.

Synthese von 2-Hexadecensäure durch FMN-freie Fettsäuresynthetase

Die Fettsäuresynthetase ist in der Lage 2-Hexadecensäure als Endprodukt abzugeben, wie die bisherigen Versuche zeigten. Es mußte daher auch möglich sein, mit einer nach (5) bereiteten FMN-freien Synthetase, die ja nicht mehr in der 2. Reduktion aktiv sein kann, 2-Hexadecensäure zu synthetisieren. Fig. 31 zeigt das Produktspektrum eines Inkubationsansatzes des FMN-freien Enzyms mit Myristyl-CoA, ^{14}C -Mal-CoA und NADPH als Substrate. Die 2-Hexadecensäure wird erwartungsgemäß gebildet. Daneben treten auch Palmitin- und Stearinsäure auf, was auf eine nicht vollständige FMN-Abspaltung vom Enzym zurückzuführen ist.

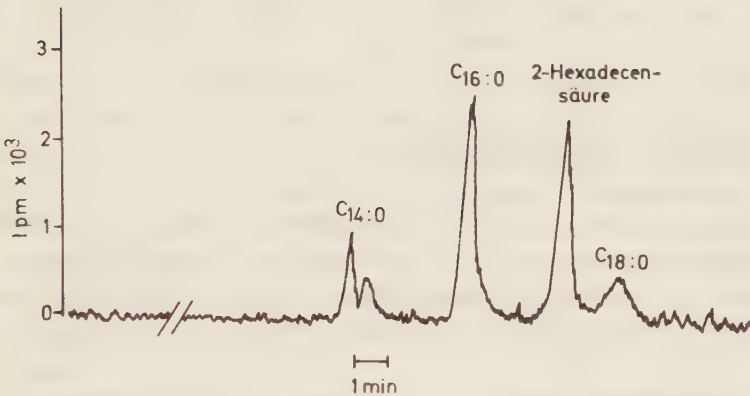


Fig. 31: Radiogaschromatographischer Nachweis der Bildung von 2-Hexadecensäure durch FMN-freie Fettsäuresynthetase (Ausführung siehe S. 99).

β -Ketosäuren und α, β -ungesättigte Säuren als CoA-Derivate.

Die gesättigten Fettsäuren werden von der Fettsäuresynthetase als CoA-Derivate freigesetzt. Ob auch die β -Keto- und α, β -ungesättigten Säuren als CoA-Derivate vorliegen wurde durch saures Abstoppen eines entsprechenden Inkubationsansatzes geprüft: Freie β -Ketosäuren bzw. die Ketone (durch Decarboxylierung) sowie die α, β -ungesättigten Säuren müssen aus saurer Lösung mit Petroläther extrahierbar sein, nicht jedoch die entsprechenden CoA-Derivate. Bei Verwendung reiner Malonyl-CoA-Präparate (d. h. frei von N-Acylcysteamin, s. Kap. V) konnte aus saurer Lösung fast keine Radioaktivität extrahiert werden, dagegen erschienen Ketone und α, β -ungesättigte Säuren nach Verseifung im Petrolätherextrakt (Tab. 5). Wir schließen daraus, daß auch die β -Ketosäuren und α, β -ungesättigten Säuren vom Enzym auf CoA übertragen werden.

Extrahierte Radioaktivität aus saurer Lösung	3000 IpM
Extrahierte Rad. nach Verseifen	210000 IpM

Tabelle 5

7. Zusammenfassende Diskussion des Modells

Die Gültigkeit der aus dem vorgestellten Modell abgeleiteten Formel (6) zur Beschreibung der Endproduktverteilung wird durch die geschilderten Versuche über einen weiten Bereich experimenteller Bedingungen gestützt. In ihrer allgemeinsten Formulierung beschreibt sie den Kettenabbruch der Fettsäuresynthese durch folgende Prinzipien:

a/ Das Geschwindigkeitsverhältnis von Kondensations- und Übertragungsreaktion bestimmt für jeden gesättigten Acylrest die Wahrscheinlichkeit seiner Übertragung.

b/ Dieses Geschwindigkeitsverhältnis ist für die kurzkettigen Säuren $C_6 - C_{12}$ etwa gleich. Ab einer Kettenlänge von 13 C-Atomen setzt eine Wechselwirkung der Alkankette mit dem Enzym ein. Die aus dieser Wechselwirkung resultierende freie Energie ΔF beeinflusst das Verhältnis von Kondensations- und Übertragungsgeschwindigkeit zugunsten der Übertragungsgeschwindigkeit oder zuungunsten der Kondensationsgeschwindigkeit. Mit dem Erreichen einer Kettenlänge von 16 bzw. 18 C-Atomen ist dieses Geschwindigkeitsverhältnis unter Normalbedingungen so verschoben, daß eine weitere Verlängerung dieser Acylreste unwahrscheinlich wird.

c/ Die Kondensationsreaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex. Deshalb hat nur der gesättigte Acylrest eine hinreichend lange Lebensdauer, um auf CoA übertragen zu werden und damit Produkt zu bilden. Wird eine andere Teilaktivität verlangsamt und damit die Lebensdauer einer Zwischenstufe verlängert, so tritt auch diese als Endprodukt auf.

In der Interpretation von Gleichung (6) sind mehrere Möglichkeiten der Beeinflussung des Geschwindigkeitsverhältnisses von Kondensation und Transfer durch die Wechselwirkungsenergie denkbar:

α / Eine hydrophobe Wechselwirkung an der Transferase mit negativem ΔF führt, wie gezeigt, den Faktor $e^{-\frac{m\Delta F}{RT}}$ über die Gleichgewichtskonstante K_T ein.

β / Dieser Faktor könnte auch durch K_K eingeführt werden, wenn dieses Gleichgewicht mit einem positiven ΔF -Inkrement beeinflusst werden würde. Es ergäbe sich dann ein mit Gleichung (6) identischer Ausdruck. Ein solches positives Energieinkrement könnte z. B. durch einen hydrophilen Bereich am kondensierenden Teilenzym zustande kommen, vorausgesetzt, der langkettige Acylrest muß aus einem hydrophoben Milieu an dieses Teilenzym transportiert werden. Das aber ist wiederum nicht mit dem Schwingarmcharakter der zentralen SH-Gruppe vereinbar (s. S. 2). Ein Übergang aus wässrigem Medium an einen hydrophilen Bereich aber kann kein positives Energieinkrement liefern.

Möglicherweise könnte man eine zunehmende sterische Hinderung zur Deutung heranziehen.

γ / Formal könnte der Faktor $e^{-\frac{m\Delta F}{RT}}$ auch über die Geschwindigkeitskonstanten k eingeführt werden, was jedoch zumindest für k_T durch den erwähnten Versuch von SCHWEIZER (s. S. 18) ausgeschlossen wird.

Das Modell begründet die Variation des Produktspektrums bei Variation der Substratkonzentrationen von Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und NADPH.

Welche Bedeutung der β-Ketosäuresynthese durch limitierende Mengen NADPH oder mit NADH in vivo zukommt ist schwer zu entscheiden. Immerhin sind langkettige β-Ketosäuren als Bestandteile von Glyceriden nachgewiesen (36-38). Ferner machten ¹⁴C-Acetat-Einbauversuche von LAWRENCE und HAWKE (39) wahrscheinlich, daß diese β-Ketosäuren nicht durch β-Oxydation gesättigter Fettsäuren, sondern in einer de novo Synthese entstehen. Die beschriebenen Versuche an der Fettsäuresynthetase zei-

gen, daß sie für diese Synthese in der Zelle verantwortlich sein könnte.

8. Der Einfluß der Parameter Temperatur und pH auf das Produktmuster der Fettsäuresynthese.

Abschließend wurde noch der Einfluß der Parameter Temperatur und pH auf das Produktmuster untersucht. Eine Vorausberechnung war in diesen Fällen nicht möglich, da der Einfluß dieser Parameter auf die Teilaktivitäten (vor allem Kondensation und Transfer) nicht gemessen wurde.

a. Temperatur

Der Standardtest der Fettsäuresynthetase wird bei 25°C ausgeführt. Das hierbei entstehende Produktmuster ist auf S. 31 dargestellt. Die Syntheseprodukte einer Inkubation bei 40°C sind in Tab. 6 zusammengestellt. Gegenüber den Standardbedingungen treten nur unwesentliche Verschiebungen auf; lediglich das Auftreten geringer Mengen

40°C	C ₁₄	3 %	0°C	C ₁₄	5 %
	C ₁₆	41 %		C ₁₆	65 %
	C ₁₈	45 %		C ₁₈	25 %
	Ketone	9 %			

Tabelle 6: Einfluß der Temperatur auf das Produktspektrum.

der β -Ketoacyl-Verbindungen ist bemerkenswert. Bei 0°C beträgt die Anfangsgeschwindigkeit in der Gesamtsynthese nur ungefähr 1/8 gegenüber der 40°C-Geschwindigkeit. Die Analyse eines Inkubationsansatzes bei 0°C ergibt eine Verschiebung in den Endprodukten zugunsten der Palmitinsäure. Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Kondensationsreaktion eine größere Aktivierungsenergie als die Transferreaktion benötigt und somit stärker verlangsamt wurde.

b/ Der pH-Einfluß

Der Standardansatz wird im Aktivitätsoptimum der FSS (9) bei pH 6,5 oder 7,5 durchgeführt. Tab. 7 stellt die Produktverteilungen bei extremeren pH-Werten gegenüber. Zu sauren pH-Werten hin beobachtet man keine Veränderungen gegenüber den Stan-

	pH 5,5		pH 8,5	pH 9,5
C ₈	1	%	2	9
C ₁₀	1	"	3	6
C ₁₂	1	"	2	7
C ₁₄	2	"	5	11
C ₁₆	40	"	57	53
C ₁₈	54	"	28	14

Tabelle 7: Einfluß des pH-Wertes auf das Produktspektrum

dardbedingungen, während im alkalischen Bereich der Anteil kürzerkettiger Säuren zunimmt. Wiederum scheint das Verhältnis von Kondensationsgeschwindigkeit und Transfergeschwindigkeit im alkalischen Bereich zugunsten der letzteren verschoben zu werden.

V. Die Fettsäuresynthese mit Substratmodellen.

Bei den auf Seite 51 beschriebenen Versuchen, die klären sollten, ob auch die β -Ketosäuren als CoA-Derivate vom Multienzymkomplex freigesetzt werden, war zunächst immer ein erheblicher Anteil der inkorporierten Radioaktivität aus dem mit Säure abgestoppten Inkubationsansatz mit Petroläther extrahierbar. Das hätte bedeutet, daß freie Säuren bzw. Ketone vorliegen. Die gaschromatographische Analyse dieses Extrakts ließ aber weder freie Säuren noch Ketone auffinden. Erst nach zusätzlicher Alkalibehandlung dieses Extrakts tauchten Palmitin- und Stearinsäure, sowie Ketone im Gaschromatogramm auf. Dieser Befund bewies, daß nicht die freien Säuren, sondern verseifbare Derivate aus der sauren Inkubationslösung extrahiert wurden. Da auch nach Perameisensäurebehandlung des Extrakts die Säuren freigesetzt waren mußten lipidlösliche Thioesterderivate vorliegen. Offensichtlich wurde mit einem Substrat eine Thiolverbindung eingeschleppt, die wie CoA als Acceptor für den enzymgebundenen Acylrest fungieren konnte. Malonyl-CoA konnte noch geringe Mengen N-Capryloylcysteamin enthalten (s. Darstellung S. 83). Aus diesem Grund wurde das Malonyl-CoA durch Ionenaustauschchromatographie (57) nachgereinigt. Bei der Wiederholung der Versuche mit gereinigtem Malonyl-CoA war es dann tatsächlich nicht mehr möglich, Radioaktivität aus dem sauer abgestoppten Inkubationsansatz zu extrahieren. Setzte man dem Inkubationsansatz N-Acetylcysteamin zu, so war etwa die Hälfte der inkorporierten Radioaktivität aus saurer Lösung extrahierbar (Tab. 8). Damit war bewiesen, daß auch N-Acylcysteamin Acylreste vom Multienzymkomplex übernehmen kann.

extrahierbare Radioakt. aus sauer gestoppter Inkubationslösung (N-Acylcysteamin-frei)	 3.000 IpM
identischer Ansatz + 10 μ Mol/ml N-Acylcysteamin	 110.000 IpM

Tab. 8: N-Acylcysteamin als Acyl-Acceptor.

Dieser Befund ließ vermuten, daß die Fettsäuresynthese auch durch die Acetyl- und Malonylderivate des N-Acylcysteamins anstelle von Acetyl- und Malonyl-CoA gestartet werden kann. Fig. 32 zeigt das entsprechende Experiment: Auch mit diesen Substratmodellen S-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin beobachtet man enzymatische Aktivität der FSS im optischen Test.

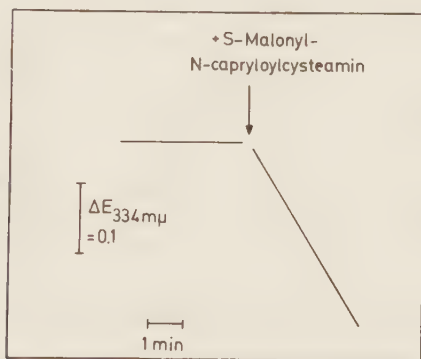


Fig. 32: Optischer Test der FSS mit den Substratmodellen S-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin.

Fig. 33 und 34 geben die Substratabhängigkeiten von S-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin wieder. Die gefundenen Michaeliskonstanten sind (41):

S-Acetyl-N-acetylcysteamin	$K = 2 \cdot 10^{-4} \text{ (Mol/L)}$
S-Malonyl-N-capryloylcysteamin	$K = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ (Mol/L)}$

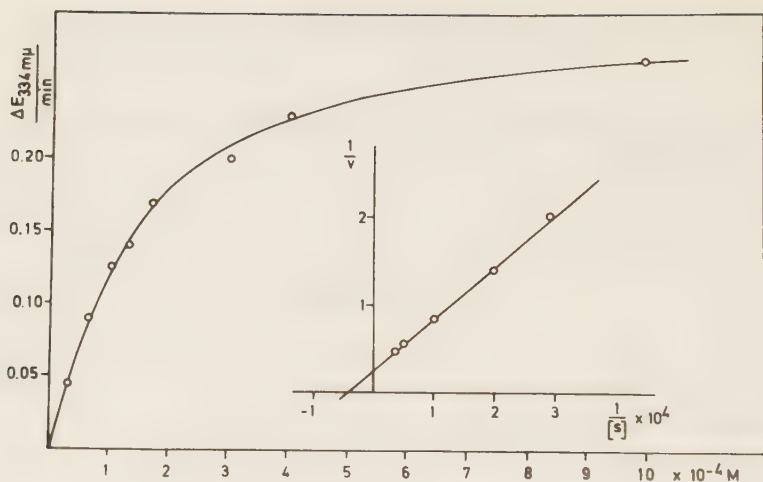


Fig. 33: Substratabhängigkeit für S-Acetyl-N-acetylcysteamin (Ausführung siehe S.100)

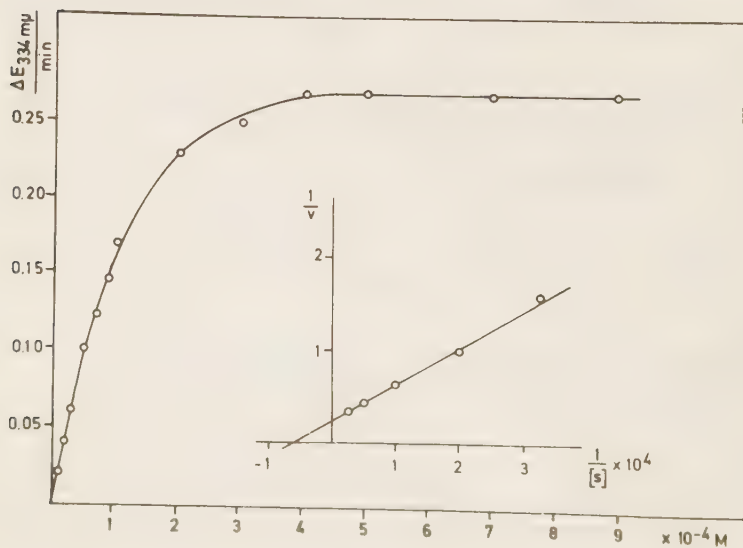


Fig. 34: Substratabhängigkeit für S-Malonyl-N-capryloylcysteamin (Ausführung siehe S.100)

Die erreichbare Umsatzgeschwindigkeit mit den Substratmodellen liegt unter Sättigungsbedingungen bei 70 % der Maximalgeschwindigkeit mit Acetyl- und Malonyl-CoA als Substrate. Die Aktivitätsbestimmung mit den Substratmodellen zeigt eine lineare Enzymabhängigkeit (Fig. 35).

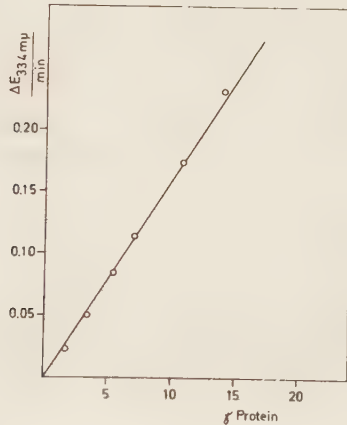


Fig. 35: Enzymabhängigkeit der optischen Bestimmung der Fettsäuresynthese-Aktivität mit den Substratmodellen.

Die Gleichwertigkeit der Substratmodelle und "natürlichen" Substrate prüften wir durch die Untersuchung der Syntheseprodukte eines Inkubationsansatzes mit S-¹⁴C-Acetyl-N-acetylcysteamin, S-Malonyl-N-capryloylcysteamin und NADPH als Substrate der FSS. Fig. 36 bestätigt, daß auch unter diesen Bedingungen Palmitin- und Stearinsäure bzw. ihre N-Acylcysteaminderivate synthetisiert wurden.

Bemerkenswerterweise ist das Produktverhältnis stark zugunsten der Stearinsäure verschoben. Nach dem Modell des Kettenabbruchs (s. S. 18) sollte das genau dann eintreffen, wenn entweder die Kondensations- relativ zur Transfargeschwindigkeit vergrößert wurde, oder - gleichbedeutend - die Transfargeschwindigkeit relativ zur Kon-

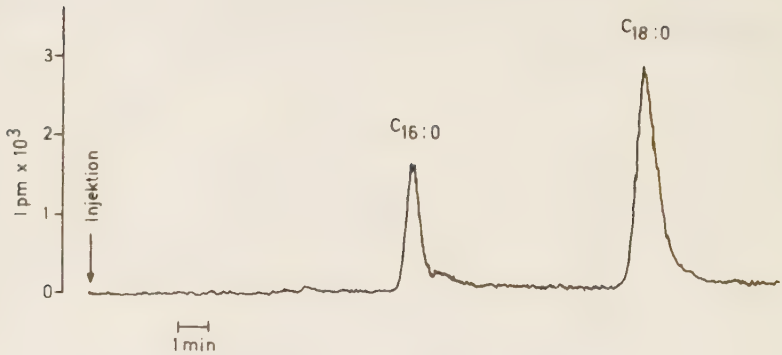


Fig. 36: Radiogaschromatogramm der Endprodukte in der Fettsäuresynthese mit den Substratmodellen S-¹⁴C-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-Capryloylcysteamin (Ausführung siehe S.100).

densationsgeschwindigkeit verlangsamt wurde. Eine Verlangsamung der Transfergeschwindigkeit ist sehr wahrscheinlich, da ja unter diesen Bedingungen der Acceptor CoA durch das Modellsubstrat N-Acylcysteamin ersetzt worden ist.

Fig. 37 zeigt die Endprodukte eines Inkubationsansatzes mit den Substratmodellen und NADH statt NADPH als Coenzym. Auch in diesem Fall treten die Ketone im Gaschromatogramm auf.

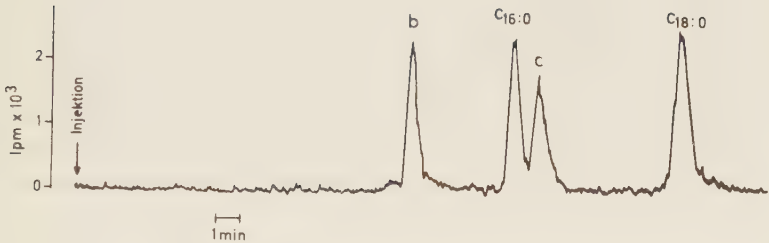


Fig. 37: Radiogaschromatogramm der Endprodukte in der Fettsäuresynthese mit den Substratmodellen S-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin, sowie NADH statt NADPH als Coenzym (Ausführung siehe S.100).
b und c: Methyltridecylketon und Methylpentadecylketon.

YALPANI, WILLECKE und LYNEN (42) fanden, daß bei Inkubation der FSS mit Acetyl- und Malonyl-CoA, aber ohne NADPH ein Entgleisungsprodukt, nämlich Triacetsäurelaktan gebildet wird. Wir wiederholten diesen Versuch, jedoch mit den Substratmodellen S-¹⁴C-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin. Fig. 38 zeigt die gaschromatographische Analyse der Reaktionsprodukte. Es ist ebenfalls Triacetsäurelaktan gebildet worden.

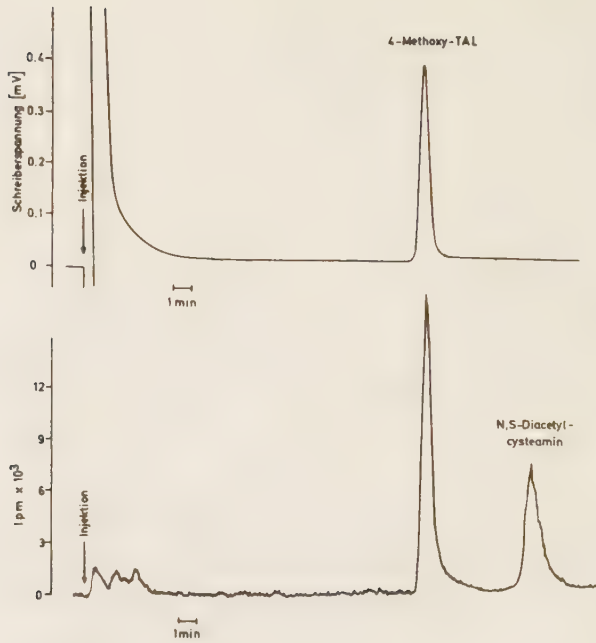


Fig. 38: Radiogaschromatographischer Nachweis von enzymatisch gebildeten Triacetsäurelaktone mit den Substratmodellen $S-^{14}C$ -Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin (Ausführung siehe S. 100).

In allen geprüften Fällen zeigen die Substratmodelle analoges Verhalten wie die "natürlichen" CoA-Derivate. Lediglich die erreichbaren Umsatzgeschwindigkeiten und die Affinitäten zum Enzym sind geringer.

VI. Dissoziation und Rekonstitution des Multienzymkomplexes.

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Struktur und Organisation des Multienzymkomplexes ist die experimentelle Möglichkeit, den Komplex - wenn möglich reversibel - in Untereinheiten zerlegen zu können. Frühere Versuche mit Harnstoff, Guanidinhydrochlorid, Detergentien, Säuren und Basen (43, 44) führten zwar zur Spaltung, jedoch wurden gleichzeitig Struktur und enzymatische Aktivitäten irreversibel geschädigt. Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, die zu einer reversiblen Dissoziation des Multienzymkomplexes in Untereinheiten führten.

1. Spaltung durch Einfrieren und Auftauen salzhaltiger Enzymlösungen.

Native FSS kann ohne Änderung ihres Elektrophorese- und Sedimentationsverhaltens in 1 M NaCl oder LiCl gelöst werden. Auch hat diese Behandlung keinen Verlust der enzymatischen Aktivität zur Folge. Friert man eine solche Lösung jedoch zwei- bis mehrere Male für fünfzehn Minuten auf ca. -70°C ein und läßt bei Raumtemperatur auftauen, so hat sich das enzymatische und physikalische Verhalten stark verändert. Fig. 39 zeigt das Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge. Bereits nach einmaligem Einfrieren und Auftauen (39 B) treten langsamer sedimentierende Proteinspecies auf. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen ist keine native FSS mehr vorhanden und die enzymatische Aktivität in der Gesamtsynthese auf Null abgesunken (Fig. 39 C).

Den entsprechenden Befund liefert die analytische Disk-Elektrophorese in 6 %igem Polyacrylamidgel. Native FSS bleibt unter diesen Bedingungen wegen ihres hohen Molekulargewichtes am Start liegen (Fig. 40). Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen derselben Probe erhält man das in Fig. 40 abgebildete Elektrophoresemuster: Offensichtlich ist der Multienzymkomplex in Untereinheiten zerlegt. Das Elektrophoresemuster ist vollständig reproduzierbar, es ändert sich auch bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen nicht mehr wesentlich.

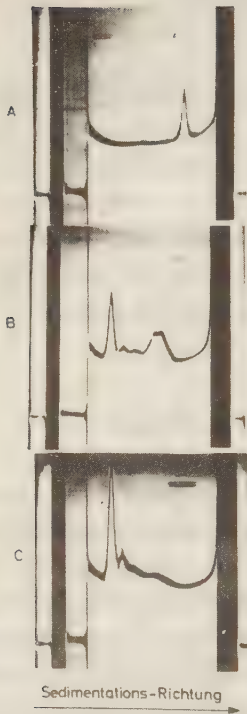


Fig. 39:

Änderung des Sedimentationsverhaltens der Fettsäuresynthetase durch Einfrieren und Auftauen einer LiCl-haltigen Lösung

A) FSS (3 mg/ml) in 1 M LiCl

B) FSS (10 mg/ml) in 1 M LiCl nach einmaligem Einfrieren und Auftauen.

C) Wie B), jedoch nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen.

Alle Aufnahmen wurden 14 min nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit (59 780 UpM) gemacht. 20°C.



Fig. 40: Diskelektrophorese in 6 %igem Polyacrylamidgel, pH 9,5.

links: FSS in 1 M LiCl; rechts: Gleiche Präparation nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen.

Einen weiteren Beweis für die strukturellen Veränderungen des Komplexes erbringt die Messung der Reaktivität seiner Thiolgruppen mit DTNB, dem sog. Ellmans Reagens (vgl. S. 7). Wie die Aminosäureanalyse der FSS ergab (21), enthält der Komplex 140 Cysteine. Diese liegen weitgehend in der Thiolform vor, wie durch optische Bestimmung an der Harnstoff-denaturierten Synthetase mit DTNB (s. S. 8) ermittelt wurde. Weniger als 20 % dieser Thiolgruppen reagieren beim nativen Enzym innerhalb von fünf Minuten ab, wie aus Fig. 41 zu ersehen ist. Die nicht oder

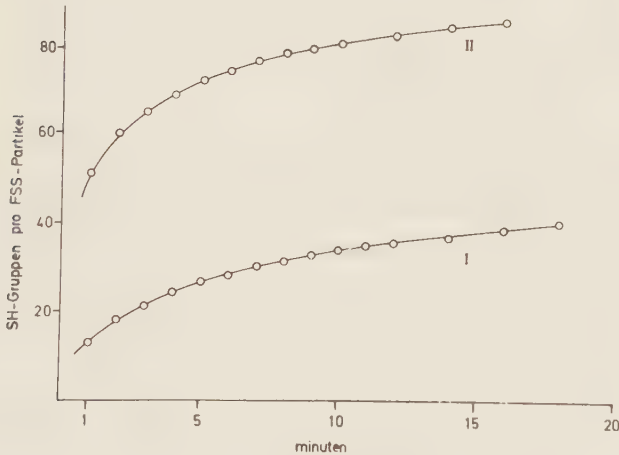


Fig. 41: Reaktionskinetik der Enzymthiolgruppen mit DTNB.
2,25 mg/ml Protein, 10^{-3} M DTNB
Kurve I: FSS in 1 M NaCl.
Kurve II: Gleiche Präparation nach zweimaligem
Einfrieren und Auftauen.

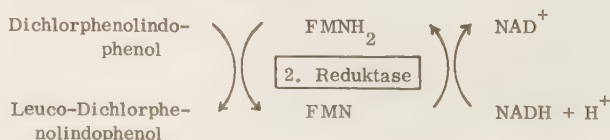
sehr langsam reagierenden Thiolgruppen der Synthetase sind offenbar durch die gegebene Tertiär- und Quartärstruktur mehr oder weniger abgeschirmt. Bei einer Dissoziation des Multienzymkomplexes sollten diese teilweise freigelegt und damit eine Er-

höhung der Zahl reaktiver Thiolgruppen erwartet werden. Kurve II in Fig. 41 bestätigt dies: Sie gibt die Reaktionskinetik desselben Enzympräparates nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen wieder.

Das beschriebene Einfrieren und Auftauen einer Enzymlösung hat auch die weitgehende Abspaltung des FMN vom Enzym zur Folge. Eine Sephadex G 25-Filtration des Spaltansatzes läßt zwei fluoreszierende Banden erkennen: Die grünlichgelbe Fluoreszenz des freien FMN und eine noch schwach gelbe Fluoreszenz des proteingebundenen FMN.

2. Verhalten der enzymatischen Aktivität.

Die Fähigkeit zur enzymatischen Fettsäuresyntheseaktivität bedingt die intakte enzymatische Aktivität aller Teilenzyme. Der Verlust der Gesamtaktivität (gemessen im optischen Test) hat also nicht notwendigerweise den Verlust aller Teilaktivitäten zur Folge. Die Teilaktivitäten können mit Hilfe von geeigneten Substratmodellen getrennt untersucht werden (5). Wir haben uns bisher auf die Untersuchung des Reduktionsschrittes von der β -Keto- zur β -Hydroxysäure (1. Reduktion) und des Reduktionsschrittes von dem α, β -ungesättigten zum gesättigten Acylrest (2. Reduktion) beschränkt. Die erste Reduktion wird, wie bereits erwähnt, mit dem Substratmodell S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin gemessen, während der sog. Diaphorasetest für die Bestimmung der Aktivität in der 2. Reduktion herangezogen wurde.



Nach zweimaligem bis dreimaligem Einfrieren und Auftauen einer Fettsäuresynthetase-lösung, die 1 M an LiCl ist, sind sowohl die Aktivität in der Gesamtreaktion wie diejenige in der 1. Reduktion vollständig verschwunden.

Eine Reaktivierung lässt sich jedoch bei Verringerung der Ionenstärke durch Verdünnen oder Dialyse der Lösung erreichen. Fig. 42 zeigt die Kinetik der Reaktivierung nach Verdünnen des Spaltansatzes. Bemerkenswerterweise kehrt die Teilaktivität der 1. Reduktase schneller zurück als die Gesamtaktivität, die bis zu 50 % des Ausgangswertes erreicht. Die Teilaktivität der 2. Reduktase zeigt keine Aktivierung, sie wird entweder durch die Dissoziation nicht geschädigt oder kehrt bereits innerhalb der Vorbereitungszeit für den Test (ca. 1 Minute) wieder zurück (unmittelbar nach beendetem Einfrieren und Auftauen werden noch 70 % der Ausgangsaktivität in der 2. Reduktion gefunden).

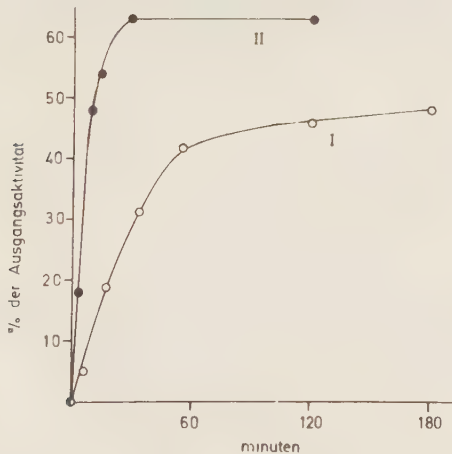


Fig. 42: Reaktivierung der Enzymaktivität (Ausführung s. S. 101).

Kurve I: FSS-Aktivität

Kurve II: Aktivität in der 1. Reduktion.

3. Reaktivierungsparameter

Der Reaktivierungsprozess ist stark temperaturabhängig, er zeigt bei 20°C ein Optimum. Bei 0°C kehrt fast keine Enzymaktivität zurück, während bei 37°C diese zwar anfänglich rasch auftritt, aber nach 90 Minuten wieder abzusinken beginnt.

Auch die Proteinkonzentration ist von Einfluß. Bei Konzentrationen unter 0,5 mg/ml verläuft die Reaktivierung weniger weitgehend (Tab. 9).

Proteinkonzentration	Reaktivierung %
2 mg/ml	50
1 "	50
0,1 "	22
0,05 "	15

Tabelle 9: Reaktivierung bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Der Zusatz von SH-Verbindungen, wie Cystein, begünstigt die Reaktivierung. Dieser Befund deutet ebenfalls darauf hin, daß Disulfidbrücken keine entscheidende Rolle für die Organisation des Multienzymkomplexes spielen (vgl. S. 7).

Die weitere Untersuchung der Spaltstücke machte es notwendig, Bedingungen zu finden, unter denen die spontane Rekombination verhindert oder verzögert werden konnte. Wir prüften zunächst, wie sich die Inkubationslösung nach beendetem Einfrieren und Auftauen ohne jede Änderung der Bedingungen verhält (also in Gegenwart der hohen Salzkonzentration). Nach 24-stündigem Stehen des Spaltansatzes bei 0°C läßt sich noch keine Veränderung des Sedimentationsmusters in der analytischen Ultrazentrifuge beobachten. Die Aufbewahrung der Spaltlösung bei 20°C ermöglicht dagegen eine, wenn auch langsame, Aggregation der Bruchstücke, wie aus Fig. 43 zu ersehen ist: Die gleiche Probe wurde nach verschieden langem Stehen bei 20°C in der analyt. UZ untersucht. Eine erste Möglichkeit zur Stabilisierung der Spaltung ist somit durch die

Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und Aufbewahren bei 0°C gegeben. Hohe Salzkonzentrationen sind jedoch bei vielen Untersuchungsmethoden (z. B. Elektrophorese) störend.

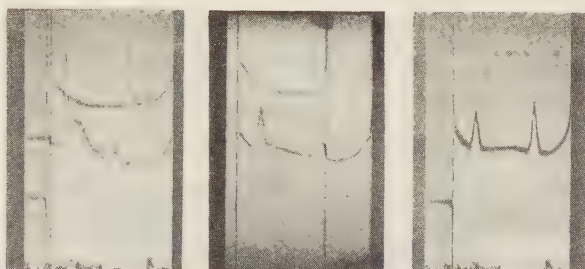


Fig. 43: Rekombination der Spaltstücke in 1 M Salzlösung bei 20°C ,
linkes Bild: Sedimentationsmuster des Spaltansatzes in 1 M
NaCl zusammen mit nativer FSS als Referenz
(darüber)

mittleres Bild: gleiche Präparation nach 4^{h} bei 20°C .

rechtes Bild: gleiche Präparation nach 18^{h} bei 20°C .

Sedimentation von links nach rechts. Alle Bilder wurden
12 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit
(59 780 UpM) gemacht.

Hier half die Untersuchung der Reaktivierbarkeit in verschiedenen Puffersystemen weiter. Tab. 10 zeigt die Reaktivierung der Fettsäuresyntheseaktivität in Phosphat- und Trispuffern verschiedener pH-Werte.

Lediglich in Phosphatpuffern des schwach alkalischen pH-Bereichs reaktiviert die Enzymaktivität bis zu 50 % des Ausgangswertes. Tris-Puffer unterbinden offensichtlich weitgehend die Rekonstitution. Die Kombination Trispuffer und tiefe Arbeitstempera-

tur (0°C) stabilisiert demnach die Spaltung. Unter diesen Bedingungen war selbst nach 24 Stunden keine Veränderung des elektrophoretischen Spaltmusters zu erkennen.

Puffer	pH	Reaktivierung %
0,1 M K-Phosphat	7,5	50
0,1 M "	5,5	10
0,1 M Tris	7,5	7
0,1 M Tris	8,5	10

Tabelle 10: Reaktivierung in verschiedenen Puffersystemen.

4. Vergleich native/rekonstituierte FSS

Für einen Vergleich des physikalischen Verhaltens von rekonstituiertem und nativem Enzym wurden Sedimentation und Elektrophorese herangezogen. Fig. 44 A zeigt unten

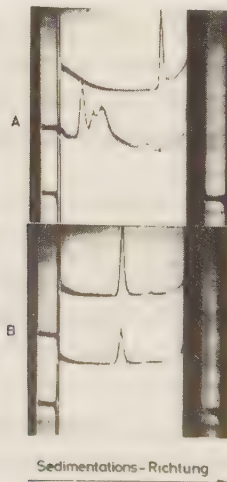


Fig. 44: Sedimentationsverhalten rekonstituierter Fettsäuresynthetase (siehe Text).

das Sedimentationsbild eines Spaltansatzes in NaCl-Lösung, darüber die Sedimentation nativer FSS als Referenz. Das untere Schlierenmuster (Fig. 44 B) gibt die Sedimentation derselben Präparation nach Reaktivierung durch Verdünnen wieder, erneut zusammen mit nativer FSS als Vergleich.

Auch die analytische Disk-Elektrophorese läßt keinen Unterschied zwischen nativer und rekonstituierter FSS erkennen, Fig. 45 zeigt von links nach rechts das Elektro-

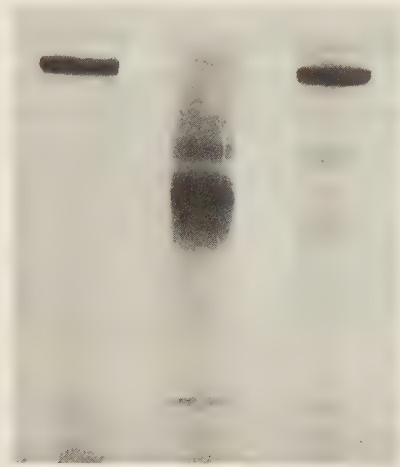


Fig. 45: Elektrophorese-Vergleich von nativer und rekonstituierter FSS.

links: FSS in 1 M LiCl

Mitte: gleiche Präparation nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen

rechts: gleiche Präparation nach Rekonstitution durch Verdünnen.

phoresemuster nativer FSS, daneben das Muster nach Dissoziation des Komplexes und schließlich dieselbe Probe nach Rekombination. Alle drei Elektrophoresen wurden in 3,4 %igem Polyacrylamidgel ausgeführt, um eine Wanderung der intakten FSS zu ermöglichen; die Spaltstücke werden in diesem großporigen Gelsystem nicht mehr sauber getrennt.

5. Versuche zur Charakterisierung der Spaltstücke.

WILLECKE (11) konnte, wie bereits einleitend erwähnt wurde, zeigen, daß der Multienzymkomplex eine Proteinkomponente vom ungefähren Molekulargewicht 16 000 enthält, die in ihrer Funktion dem von VAGELOS und Mitarbeitern (12) aus *E. coli* isolierten "acyl carrier protein" (ACP) ähnelt. Ob diese Proteinkomponente durch die beschriebene Spaltung freigesetzt wird, läßt sich wegen des sehr kleinen Molekulargewichts des ACP leicht feststellen. Außerdem kann diese spezifisch radioaktiv markiert werden: Das ACP trägt das 4'-Phosphopantethein der zentralen SH-Gruppe in kovalenter Bindung an einen Serinrest. Nach einem von WELLS et al. (45) ausgearbeiteten Verfahren werden Hefezellen in Gegenwart von ^{14}C -Pantothensäure gezüchtet und daraus die spezifisch in der ACP-Komponente markierte FSS isoliert.

Nach LiCl-Spaltung dieser ^{14}C -Synthetase wurde der Ansatz auf ein Molekülsieb (Sephadex G 100, Trennbereich bis $M = 150\,000$ (46)) aufgetragen, das mit 1 M LiCl in 0,1 M Trispuffer pH 7,5 äquilibriert war. Fig. 46 zeigt das Elutionsdiagramm: Proteinabsorption bei 280 m μ und radioaktive Markierung laufen völlig identisch. Die niedermolekulare ACP-Fraktion ist also nicht abgespalten worden, sie ist noch mit größeren Proteinkomponenten assoziiert.

Die Disk-Elektrophorese ist die bisher beste Methode zur Auftrennung der Spaltstücke. Wir versuchten deshalb mit Hilfe der radioaktiven FSS die ACP-Komponente im Elektrophoresemuster zu lokalisieren. Dazu zerschnitten wir das Polyacrylamidgel nach dem Anfärben der Proteinbanden in 1 bis 3 mm dicke Gelscheibchen. Jedes dieser Gelscheibchen wurde in einer zugeschmolzenen Ampulle mit 6 N HCl 12 bis 16 Stun-

den hydrolysiert und Aliquote des Hydrolysates im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgezählt.

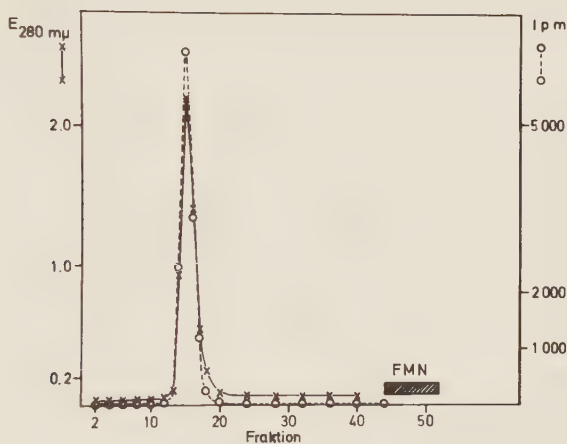


Fig. 46: Sephadex-G 100-Chromatographie von gespalte¹⁴C-Synthetase.

Fig. 47 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes. Mit Ausnahme der schnellst wandernden Proteinbande (die demnach auch das kleinste Spaltstück ist) tragen noch alle Banden radioaktive Markierung. Dieser Befund zwingt zu dem Schluß, daß diese Spaltstücke noch Assoziante von zwei oder mehreren Proteinkomponenten des Multienzymkomplexes darstellen.

Eine grobe Abschätzung des Molekulargewichtes der Spaltstücke sollte durch eine Zuckergradientenzentrifugation analog der Methode von MARTIN und AMES (47) möglich sein. Um während der Zentrifugationsdauer (35 bis 40 Stunden) die Rekombination der Spaltstücke zu verhindern, äquilibrierten wir den Saccharosegradienten zusätzlich mit NaCl oder LiCl (0,5 oder 1 M). Als Referenzenzym diente Katalase ($M = 250\,000$ (48)), die sowohl als interner als auch als externer Standard zugegeben wurde. Fig.48

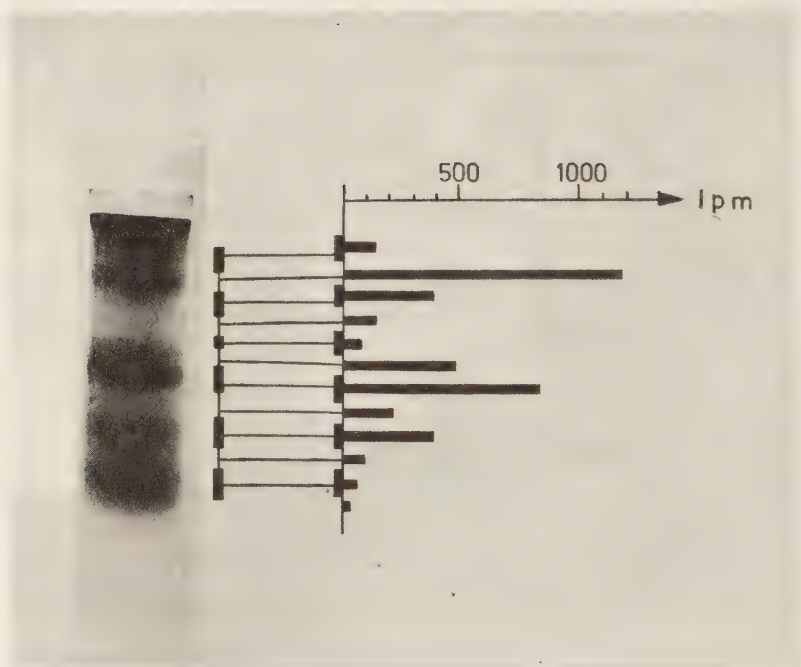


Fig. 47: Verteilung der Radioaktivität im Elektrophoresemuster gespaltenen ^{14}C -Fettsäuresynthetase (Ausführung s. S.105).

zeigt das Sedimentationsmuster eines NaCl-Spaltansatzes: Es treten zwei Proteingipfel A und B auf. Gipfel B sedimentiert annähernd gleich schnell wie Katalase. Native Fettsäuresynthetase sedimentiert unter diesen Bedingungen vollständig, wäre also in Fraktion 1 nachzuweisen. Eine abweichende Proteinverteilung beobachtet man im Sedimentationsmuster einer LiCl-Spaltung (Fig. 49). Gipfel A ist weitgehend zugunsten des Gipfels B verschwunden. LiCl bewirkt also, wie schon aus analytischen UZ-Läufen zu erkennen war, eine effektivere Spaltung zugunsten kleinerer Spaltstücke.

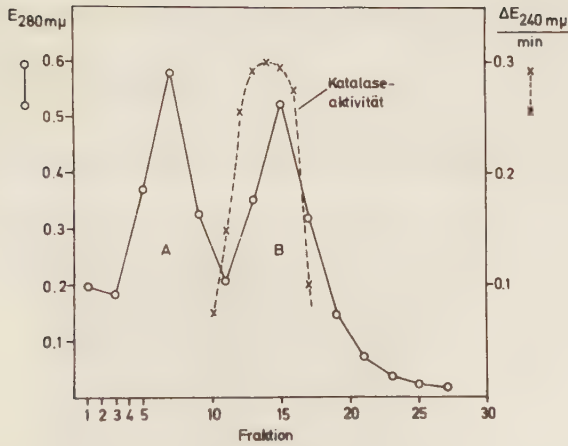


Fig. 48: Zuckergradienten-Zentrifugation eines NaCl-Spaltansatzes der FSS zusammen mit Katalase als Molekulargewichtsreferenz. (Ausführung siehe S.106).

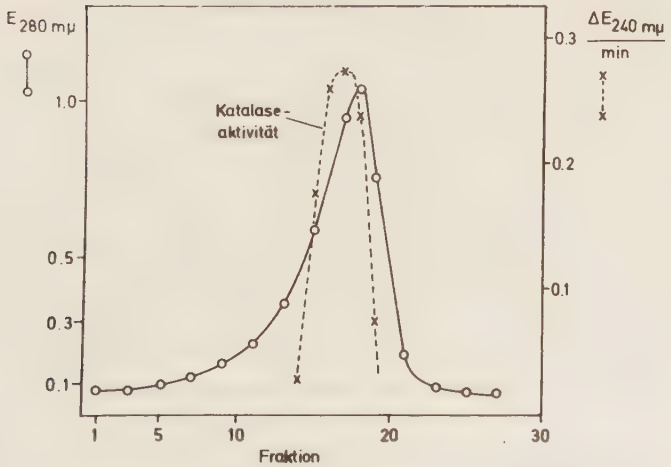


Fig. 49: Zuckergradienten-Zentrifugation eines LiCl-Spaltansatzes der FSS zusammen mit Katalase als Molekulargewichtsreferenz.

Mit der analytischen Disk-Elektrophorese kontrollierten wir die Proteinzusammensetzung der Maximum-Fraktion 15 des Gipfels B in Fig. 48. Das Elektrophoresemuster des Spaltansatzes vor der Dichtegradientenzentrifugation und das Muster der Fraktion 15 sind in Fig. 50 gegenübergestellt. Wie man erkennt sind die Spaltstücke β und γ deutlich angereichert, ferner trat während der Zentrifugationsdauer

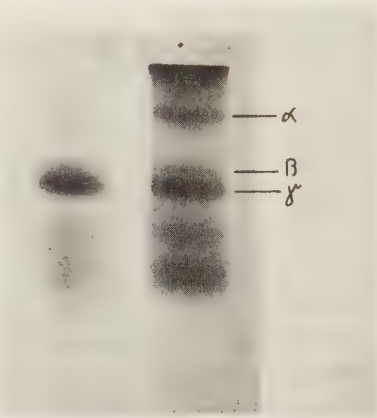


Fig. 50: Diskelektrophorese eines NaCl-Spaltansatzes vor und nach Zuckergradientenzentrifugation.
rechts: Spaltmuster vor Auftrennung
links: Fraktion 15 der Fig. 48 (Gipfel B).

keine Reassoziierung der Spaltstücke ein. Die Hauptproteinkomponente des Gipfels A (Fig. 48) zeigt vergleichbares elektrophoretisches Verhalten mit der Bande α des Spaltmusters (Fig. 50). Natürlich kann das formal berechenbare Molekulargewicht der Proteine in Gipfel B von 230 000 wegen der molekularuneinheitlichen Natur dieser Fraktion nur eine größenordnungsmäßige Abschätzung sein.

Mit der beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation war, besonders bei NaCl-Spaltungen, eine Trennung der Spaltstücke in zwei Fraktionen zu erreichen. Ob damit auch eine Trennung enzymatischer Teilaktivitäten verbunden war, konnte leicht durch

entsprechende enzymatische Testreaktionen entschieden werden. Dazu verdünnten wir die einzelnen Fraktionen einer Dichtegradientenzentrifugation auf das fünffache Volumen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, der 40 mM an Cystein war, inkubierten zwei Stunden bei 20°C, um etwa geschädigte Enzymaktivitäten zu reaktivieren und setzten dann Aliquote zum Enzymtest ein. Die Messung der Fettsäuresynthese-Aktivität ergab ein völlig unerwartetes Resultat. Wie Fig. 51 zeigt, sind beide Proteingipfel

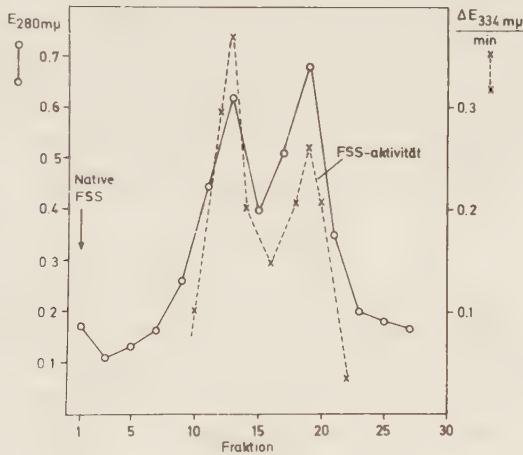


Fig. 51: Reaktivierung der FSS-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Zuckergradienten-Zentrifugation eines NaCl-Spaltansatzes.

A und B wieder aktiv in der Fettsäuresynthese geworden. Dieser Befund wurde auch durch einen radioaktiven Enzymtest bestätigt, dessen radiogaschromatographische Auswertung die erfolgte Synthese von Palmitin- und Stearinsäure durch beide Fraktionen (besonders 13 und 19 der Fig. 51) bewies. Ferner ergeben sowohl das Material der Fraktion 13 als auch dasjenige der Fraktion 19 nach Reaktivierung (durch die oben beschriebene Verdünnung) in der Disk-Elektrophorese im wesentlichen eine einzige Bande, die identisch mit nativer FSS wandert.

Offensichtlich verfügen beide Fraktionen A und B der Dichtegradientenzentrifugation

über alle Komponenten, die zur Rekonstitution des intakten Multienzymkomplexes notwendig sind, unterscheiden sich aber trotzdem in ihrem Sedimentationsverhalten. Wir kommen auf diese Befunde in der Diskussion am Ende dieses Kapitels zurück.

Fraktion A muß wegen ihrer größeren Sedimentationsgeschwindigkeit gegenüber Fraktion B die Proteinkomponenten des Multienzymkomplexes in bereits höherem Assoziationsgrad (und vielleicht weitergehender Organisation) enthalten. Es wäre deshalb plausibel, daß die Reaktivierung der Fettsäuresynthese-Aktivität in Fraktion A schneller als in Fraktion B erfolgt. In Fig. 52 ist die Kinetik der Reaktivierung für Fraktion 13 und 19 der Fig. 51 wiedergegeben, die Vermutung trifft zu.

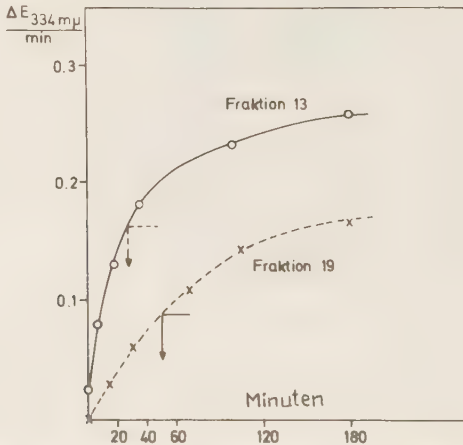


Fig. 52: Kinetik der Reaktivierung in der FSS-Aktivität für Fraktion 13 und 19 der Fig. 51.

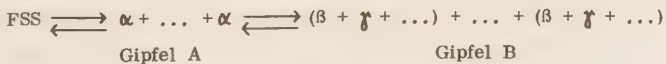
6. Diskussion

Bei einer Reihe von Enzymen konnte gezeigt werden, daß beim Einfrieren ihrer salzhaltigen Lösungen Dissoziationen bzw. Denaturierungen auftreten (49). Obgleich die Natur dieses Denaturierungsvorganges nicht geklärt ist, wird allgemein ein "Konzentrierungseffekt" als Ursache hierfür angenommen (50). In flüssigen Regionen des ge-

frorenen Systems treten hohe Salzkonzentrationen auf, die durch Veränderung physikalischer Parameter wie Ionenstärke, pH, Wasserstruktur usw. zu Denaturierungsprozessen führen.

Über spontane Rekombinationen von einfachen Enzymen mit Quartärstruktur ist mehrfach berichtet worden. Dabei bauen entweder identische (z. B. Thiolase (51)) oder zwei verschiedene Untereinheiten (z. B. Aldolase (52)) die Enzymstruktur auf. In der Selbstassoziation der Pyruvatdehydrogenase (53) aus drei Typen von Untereinheiten liegt das Beispiel eines bereits sehr viel komplexeren Enzymsystems vor. Für die Fettsäuresynthetase muß ein Aufbau aus mindestens sechs verschiedenen Enzymproteinen und zusätzlich des "acyl carrier protein" gefordert werden. Hier muß eine bereits recht komplizierte strukturelle Organisation vorliegen, die offenbar ebenfalls spontan gebildet wird.

Allerdings deuten die beschriebenen Experimente wie Molekulargewichtsabschätzung und Lokalisation des "acyl carrier protein" im Elektrophoresemuster der Spaltstücke darauf hin, daß die beschriebene Spaltung nicht bis zu den Einzelenzymen führt, sondern vielmehr zu Unterstrukturen, die noch mehrere Enzymkomponenten enthalten. Die Proteinbande α des diskelektrophoretischen Spaltmusters (Fig. 50) scheint ohne Beteiligung anderer Komponenten zu intakter FSS rekombinieren zu können, wie die Reaktivierungsversuche des Gipfels A der Dichtegradientenzentrifugation wahrscheinlich machen. Läßt sich diese Vermutung durch die präparative Isolierung der Bande α und nachfolgende erfolgreiche Rekonstitution bestätigen, so wäre bewiesen, daß der Multienzymkomplex aus (identischen) Untereinheiten aufgebaut ist, die ihrerseits noch über alle Teilenzyme der FS-Synthese verfügen müssen. Bei den Proteinbanden β und γ (Fig. 50) würde es sich dann um weitere Spaltstücke dieser Untereinheiten (der Bande α) handeln, so daß man zu folgendem Schema der Dissoziation und Rekonstitution käme:



Nach der Dissoziation des Multienzymkomplexes ist überraschend auch die Teilaktivität der 1. Reduktion auf Null abgesunken. Zwei Erklärungen sind denkbar. Entweder wird auch die native Struktur des Teilenzyms durch die Behandlung tiefgreifend geschädigt und muß sich beim Reaktivierungsprozeß dann zuerst zurtickbilden. Oder es wäre auch denkbar, daß das Teilenzym nur im Multienzymverband durch die Vielzahl der Protein-Protein-Wechselwirkungen in enzymatisch aktiver Konformation vorliegt, bei der Dissoziation jedoch in eine inaktive Konformation übergeht. Auch diese Frage kann erst durch die präparative Isolierung der Spaltstücke und definierte Reaktivierungsexperimente entschieden werden.

VII. Experimentelle Einzelheiten

1. Geräte

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg, mit Philipps-Kompensograph
Fluoreszenz-Zusatzgerät Eppendorf

Densitometeraufsatz zum Eppendorf-Photometer (Eigenbau Moosbauer)

Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II

Spektralphotometer Cary, Modell 14

Kofler-Heizmikroskop, C. Reichert A. G., Wien

Präparative Ultrazentrifuge, Beckman-Spinco, Modell L und Modell L2 65B

Gradientenpumpe Beckman, Modell 141

Analytische Ultrazentrifuge, Beckman-Spinco, Modell E

Automatic Superspeed Centrifuge, Servall RC-2

Christ Tischzentrifuge Superspeed Junior 1

pH-Meter der Fa. Püsl, München, Typ 11/12

Fraktionskollektor (Radirac, LKB, Stockholm)

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314

Dünnschicht-Scanner, Bertholt LB 2722 mit Dual Ratemeter-Integrator LB 242 K

Zellhomogenisator nach Merckenschlager und Schlossmann (40)

Camag Gleichspannungs-Speisegerät 1200 V

1/8 Zoll Edelstahlrohre, Schoeller-Werke, Hellenthal/Eifel

Folgende Geräte waren zu einer Radiogaschromatographie-Einheit zusammengeschaltet:
Gaschromatographen Aerograph 1520 oder 202 mit WLD, Varian Aerograph, Darmstadt
Tri-Carb Verbrennungsofen, Modell 325, mit heizbarer Verbindungsleitung
Tri-Carb Szintillations-Spektrometer Modelle 3101 oder 2001 mit Gasdurchfluß-
Szintillationszelle (Volumen ca. 8 ml)
Einkanal-Ratemeter Modell 280 A, Packard Instruments, Frankfurt/M.
2 Kompensationslinienschreiber, Typ 5015, Honeywell, Frankfurt/M.

2. Käufliche Chemikalien, Substrate und Enzyme

Alle Enzyme und Coenzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Im folgenden nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg)

Sephadex G 10, G 25, G 100, G 200 (Pharmacia, Uppsala)

Dowex 50 · 2, Dowex 50 · 8, Dowex 2 · 8, Acrylamid, N,N-Methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg)

p-Brombenzoylchlorid, Äthylenimin, Tetramethyläthylendiamin, Guanidinhydrochlorid⁺⁾ , Jodacetamid, Kaliumborhydrid, Tridecansäure, Pentadecansäure, Heptadecansäure, Nonadecansäure, 2-Hexadecensäure (Th. Schuchardt, München)

Thioglykol, 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Methylundecylketon, Methyltridecylketon, 2-Heptadecanol (C. Roth, Karlsruhe)

nachgereinigtes Helium (Linde, München)

1-¹⁴C-β-Alanin (NEN, USA)

1-¹⁴C-Essigsäureanhydrid, Na-1-¹⁴C-Acetat, Na₂-2-¹⁴C-Malonat, Na-¹⁴C-Hydrogencarbonat (Radiochemical Centre, Amersham, England)

NPGS, SE 30, Chromosorb WAW (Varian Aerograph, Darmstadt)

PPO, POPOP (Packard Instruments, Frankfurt/M.)

⁺⁾ wurde aus Methanol umkristallisiert

3. Synthese von Substraten

a) Acyl-CoA-Derivate

Acetyl-, Propionyl- und Butyryl-CoA wurden durch Umsetzung der entsprechenden Säureanhydride mit CoA gewonnen (54), Capryloyl-CoA nach (15), langkettige Acyl-CoA-Derivate über das gemischte Anhydrid nach (55), Malonyl-CoA nach (56). Thiol-freies Malonyl-CoA wurde entweder wie auf S. 12 beschrieben, oder nach der Methode von POTTER et al. (57) durch Ionenaustausch-Chromatographie erhalten.

1-¹⁴C-Acetyl-CoA

Es wurde nach WIELAND (55) über das gemischte Kohlensäureanhydrid in der Modifikation von LYNEN et al. (9) dargestellt. Ausbeuten bis zu 50 %.

2-¹⁴C-Malonyl-CoA

Die Vorschrift von EGGERER und LYNEN (56) wurde zur Erzielung einer möglichst hohen spezifischen Radioaktivität wie in (58) beschrieben abgeändert.

b) Sonstige Präparate und Substrate

S-Acetacetyl-N-acetylcysteamin war nach (59, 60) synthetisiert worden.

S-Malonyl-N-capryloylcysteamin wurde nach (56) hergestellt.

S-Acetyl-N-acetylcysteamin, nach (61) bereitet, wurde von Herrn Prof. EGGERER zur Verfügung gestellt.

S-1-¹⁴C-Acetyl-N-acetylcysteamin: 17 μ Mol 1-¹⁴C-Acetanhydrid (29,5 mC/mMol), die sich in einer abgeschlossenen Ampulle befanden, wurden mit flüssigem Stickstoff am

Boden der Ampulle kondensiert. Die Ampulle wurde rasch geöffnet, eine Lösung von 30 μMol N-Acetylcysteamin und 100 μMol KHCO_3 in 0,5 ml H_2O eingefüllt und im Wasserbad auf 20°C erwärmt. Dann wurden weitere 15 μMol unmarkiertes Acetanhydrid zugegeben und die Lösung nach 10 Minuten mit verd. H_2SO_4 auf pH 5 eingestellt. Die Ausbeute lag bei 90 % (bezogen auf N-Acetylcysteamin).

N-Acetylcysteamin war nach der Vorschrift von KUHN und QUADBECK (61) synthetisiert und von Herrn Dr. Willecke zur Verfügung gestellt worden.

S-(p-Brombenzoyl)-N-acetylcysteamin: 595 mg N-Acetylcysteamin (5 mMol) wurden mit 1,15 g p-Brombenzoylchlorid in 5 ml THF und 1 ml Pyridin versetzt und über Nacht verschlossen aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt, und der Rückstand in 50 ml Essigester aufgenommen. Der Essigesterauszug wurde mit verd. HCl, KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels hinterblieb ein Öl, welches spontan kristallisierte. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Toluol/Petroläther (1 : 1) wurden prächtige Nadeln vom Schmelzpunkt 93°C erhalten.

Triacetsäurelaktone war nach (62) synthetisiert worden und wurde von Herrn Dr. Seyffert zur Verfügung gestellt.

4. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Lösung wurde mit der Biuretmethode nach BEISENHERZ (63) bestimmt. Hierzu wurden 1-3 mg Protein in 1 ml H_2O mit 0,15 ml 3 M TCE ausgefällt, nach Zentrifugation in 2,5 ml H_2O suspendiert, dann mit 2,5 ml Biuretlösung (1 Liter 0,2 N NaOH enthält 9 g K-Na-Tartrat, 3 g CuSO_4 und 5 g KJ) versetzt und nach 30 Minuten die Extinktion bei 546 m μ (d = 2 cm) gegen den Blindwert bestimmt.

Es wurde ein Biuretfaktor von 8,6 verwendet (16).

Proteinverteilungen nach Trennoperationen wurden qualitativ an der 280 $m\mu$ -Absorption verfolgt.

Bei sehr verdünnten Proteinlösungen wurde die optische Bestimmungsmethode bei 215 und 225 $m\mu$ nach MURPHY und KIES (64) verwendet.

b) Gehaltsbestimmung von Thioestern

Acetyl-CoA wurde mit Malatdehydrogenase und Citratsynthase nach EGGERER und BUCKEL (65, 66) bestimmt. Die Malonyl-CoA-Gehaltsbestimmung wurde mit dem optischen Test der Fettsäuresynthetase durchgeführt. Acyl-CoA-Verbindungen und S-Acylcysteamin-Derivate wurden entweder im Hydroxamsäuretest nach STADTMAN (67) oder durch ihre Thioesterabsorption bei 232 $m\mu$ (68) bestimmt.

c) Radioaktivität

Die ^{14}C -Bestimmungen wurden im Szintillationszähler oder Methandurchflußzähler (bei DC und Papier-Chromatogrammen) durchgeführt.

Toluol-Szintillationslösung:

1 Liter destilliertes und über basisches Aluminiumoxid filtriertes Toluol enthält 4 g PPO und 200 mg POPOP.

Dioxan-Szintillationslösung:

1 Liter destilliertes Dioxan enthält 100 g Naphthalin, 10 g PPO und 250 mg POPOP.

Toluollösliche Substanzen wurden direkt in der Toluolszintillationslösung gelöst und ausgezählt (Zählausbeute um 70 %).

Wässrige Lösungen wurden auf Whatman I Papier ($3 \cdot 1,7$ cm) aufgetragen, eingetrocknet und unter der Toluollösung gezählt oder direkt in der Dioxan-Szintillationslösung bestimmt.

5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresynthetase

Die Anreicherung der FSS aus Bäckerhefe erfolgt wie von OESTERHELT (16) und LYNEN (69) beschrieben. Die so isolierte FSS zeigt jedoch in der analytischen Disk-Elektrophorese (S. 102) noch sechs Proteinbanden als Verunreinigungen, die zusammen etwa 10 - 20 % ausmachen (Fig. 53). Die Anreicherung wurde deshalb um eine Zonalzentrifugation in einem 10 - 30 %igen Zuckergradienten (Gesamtvolume 600 ml) erweitert. Jeweils 400 mg Protein (in 20 ml) wurden auf den Gradienten aufgesetzt, die Zentrifugationsdauer war 3 Stunden bei 48 000 UpM. Die so nachgereinigte FSS zeigt in der Disk-Elektrophorese keinerlei Verunreinigung mehr (Fig. 53).

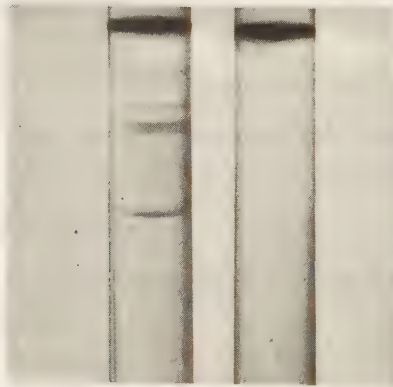


Fig. 53: Disk-Elektrophorese eines Fettsäuresynthetasepräparates vor (links) und nach (rechts) Zonalzentrifugation.

Die Enzymlösung in 0,1 M K-Phosphat pH 6,5, die zusätzlich 0,001 M an Dithiothreitol war, wurde bis zu 90 % Ammoniumsulfatsättigung gebracht und so bei -15°C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden Aliquote davon durch Ultrazentrifugation (2 Stunden bei 40 000 UpM) oder Sephadex G 25-Filtration entsalzt.

Standard-Enzymtest

Eine Küvette enthält im Volumen 1 ml: 100 μMol K-Phosphat pH 6,5, 10 μMol Cystein, 0,2 mg Serumalbumin, 0,07 μMol Acetyl-CoA, 0,2 μMol NADPH und ca. 5 μg Enzym. Nach 2 - 3 Minuten langer Beobachtung des Blindlaufes bei 334 m μ und 25°C wird mit 0,1 μMol Malonyl-CoA die Fettsäuresynthese gestartet.

1 Einheit ist diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 1 μMol Malonyl-CoA (bzw. 2 μMol NADPH) pro Minute umsetzt.

6. Zu Kapitel II

a) Darstellung von p-Brombenzoylpantethein.

α . Synthese der benötigten Ausgangssubstanzen

Kaliumhydrogensulfid

In eine Lösung von 20 g KOH in 400 ml abs. Alkohol wurde ein kräftiger H_2S -Strom, der durch ein CaCl_2 -Rohr (1 m lang) von mitgerissenem Wasser befreit worden war, bis zur Sättigung eingeleitet (Dauer ca. 8 Stunden). Nach beendeter Umsetzung wurde noch weitere 2 Stunden Stickstoff eingeleitet, um das überschüssige H_2S -Gas auszutreiben. Nach Filtration wurde die leuchtend gelbe KHS-Lösung unmittelbar zur weiteren Umsetzung benützt.

p-Bromthiobenzoessäure

Die von JOHNSON (70) beschriebene Synthese führte zu einem unreinen Produkt, so daß die Vorschrift wie folgt verändert wurde:

In 400 ml alkoholische KHS-Lösung wurde das verflüssigte p-Brombenzoylchlorid rasch eingetroppt. Das ausgefallene KCl wurde abfiltriert und die Lösung bis zur Ausscheidung der ersten Kristalle eingengt. Nach einstündigem Stehen bei 0°C hatte sich ein dicker Kristallbrei gebildet, welcher abgenutscht wurde. Das erhaltene K-Salz wurde aus 300 ml abs. Alkohol umkristallisiert, in Wasser aufgenommen und mit HCl angesäuert. Die ausgefallene Rohsäure wurde in Chloroform gelöst, die Lösung zweimal mit verdünnter HCl gewaschen und dann bis zur beendeten CO₂-Entwicklung mit NaHCO₃-Lösung extrahiert. Nach Ansäuern des Extraktes und Abfiltrieren wurde das Rohprodukt aus Petroläther/Toluol (2 : 1) umkristallisiert. Gelbe Prismen vom Schmelzpunkt 77°C. Die Ausbeuten lagen um 70 %.

B. Synthese von p-Brombenzoylpantethein

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die von SCHWYZER (71, 72) beschriebene Synthese des S-Benzoylpantetheins:

3,3 g Calciumpantothenat (13,8 mM) wurden in 4 ml Wasser gelöst und mit 3,3 ml Triäthylamin versetzt. Das Calcium wurde durch Zugabe einer Lösung von 0,72 g Oxalsäure (13,8 mM) in 3 ml Wasser als Oxalat gefällt, abfiltriert und mehrmals mit wenig Wasser ausgewaschen. Die wässrige Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der harzige Rückstand über P₂O₅ mehrere Tage getrocknet. Das so erhaltene Triäthylammoniumpantothenat (4,4 g) wurde in 10 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf -5°C abgeköhlt, 1,23 ml Chlorkohlensäureäthylester (1,39 g, 12,9 mM) in 8 ml Essigester zutropft und die Mischung 10 Minuten bei -10°C gerührt, wobei Triäthylammoniumchlorid feinkristallin ausfiel. Samt diesem wurde das entstandene Pantothensäure-Kohlensäure-Anhydrid zu einer auf -5°C gekühlten Lösung von 0,79 ml

Äthylenimin (0,66 g, 15,3 mM) und 2,27 ml Triäthylamin (1,65 g, 16,3 mM) in 15 ml Essigester zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde ca. 30 min bei -5°C gehalten und dann in eine eiskalte Lösung von 3,62 g (16,7 mM) p-Bromthiobenzoessäure in 30 ml Essigester eingetropft. Nach einstündigem Stehen bei 0°C wurde die Reaktionslösung im Ölpumpenvakuum von sämtlichen Lösungsmitteln befreit und der teils kristalline, teils ölige Rückstand in einem Liter Wasser aufgerührt. Die so entstandene Suspension (es geht nicht alles in Lösung) wurde dann fünfmal mit je 100 ml Äther extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase vom noch Ungelösten abgetrennt und zehnmal mit je 50 ml Essigester ausgeschüttelt. Nach Einengen des Essigesterextraktes hinterbleibt ein hochviskoses Öl, das in wenig heißem Essigester aufgenommen wurde und dann 40 Stunden im Tiefkühlraum bei -15°C stand. Nach dieser Zeit setzte die Kristallisation in verwachsenen Mikrokriställchen ein. Ohne Einengen der Mutterlauge konnten 650 mg p-Brombenzoylpantethein (10,2 % Ausbeute) erhalten werden.

γ. Charakterisierung des p-Brombenzoylpantetheins

Die verzögerte Nitroprussidreaktion zeigt das Vorliegen der Thiolestergruppierungen.

Fig. 54 zeigt das UV-Spektrum in methanolischer Lösung. Es treten zwei Absorptionsmaxima bei 255 mμ und 273 mμ auf, die für p-Brombenzoylthioester charakteristisch sind, wie der Vergleich mit der Modellsubstanz S-(p-Brombenzoyl)-N-acetylcysteamin zeigt.

Für die CH- und N-Analyse wurde das p-Brombenzoylpantethein zweimal aus wenig Essigester umkristallisiert und 5 Stunden im Ölpumpenvakuum bei 40°C getrocknet:

	C (%)	H (%)	N (%)
theoretisch:	46,85	5,44	6,08
gefunden:	46,84	5,64	6,07

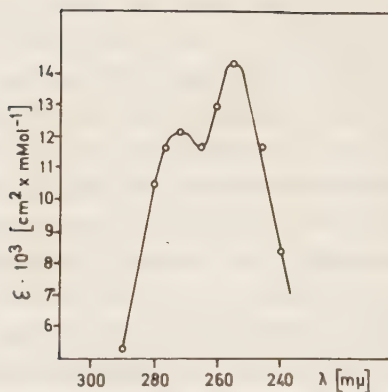


Fig. 54: UV-Spektrum des p-Brombenzoylpantetheins.

Das NMR-Spektrum entspricht, abgesehen vom Signal der aromatischen Wasserstoffatome des nunmehr vorliegenden A_2B_2 -Systems, vollkommen dem NMR-Spektrum des Benzoylpantetheins.

Die Substanz schmilzt bei 114°C .

5 mg des p-Brombenzoylpantetheins wurden mit Ammoniak in methanolischer Lösung verseift (Raumtemperatur, 20 min). Die Verseifungsprodukte wurden aufsteigend auf Whatman I Papier mit Butanol/Wasser/Eisessig (4 : 5 : 1) chromatographiert. Entwickelt wurde mit Natriumprussid-Kaliumcyanid-Lösung (73, 74), es entstand ein einziger Fleck mit einem R_f -Wert von 0,78, welcher freiem Pantethein zuzuordnen war, wie der Referenzversuch mit authentischem Benzoylpantethein ergab.

7. Zu Kapitel III

a) SH-Gruppen der Fettsäuresynthetase

Die Meßküvette enthielt im Volumen 2 ml:

200 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, die in Fig. 3 angegebene Menge Harnstoff bzw. Detergens und 2 - 4 mg Thiol-freie FSS. Nach 3 Minuten Vorinkubation (Blindlauf, Abgleichen von Meß- und Referenzküvette) wurde durch Zugabe von 4 μ Mol DTNB zu Meß- und Referenzküvette die Titration der Thiolgruppen gestartet und die Extinktionsänderung bei 405 $m\mu$ beobachtet. Reaktionstemperatur 22°C. Berechnung mit $E_{405} = 13\,300 \text{ mMol/cm}^2$.

b) Messung der Deacylaseaktivität der Fettsäuresynthetase (16, 75)

Eine Thiol-freie Synthetaselösung (Sephadex G 25-Filtration) mit 10 - 20 mg Protein/ml wurde mit DTNB bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Aliquote dieser Lösung (bis zu 7 mg) wurden in einer 10^{-3} M Lösung von DTNB in 0,1 M K-Phosphat pH 6,5 mit 0,5 μ Mol Acyl-CoA versetzt (Gesamtvolumen 2 ml) und die zeitliche Extinktionszunahme bei 405 $m\mu$ beobachtet. Grundlage der Aktivitätsberechnung ist der oben angegebene Extinktionskoeffizient des Thiophenolats bei 405 $m\mu$.

c) Beladungsversuche der Fettsäuresynthetase

Die Küvettenanordnung und die eingesetzten Substanzmengen sind auf S.13 und in Tab. 2 und 3 wiedergegeben.

8. Zu Kapitel IV

a) Radiogaschromatographie

α. Bereitung des Säulenfüllmaterials

150 g Chromosorb wurden in einem Liter halbkonzentrierter Salzsäure eingetragen und die Suspension unter gelegentlichem, vorsichtigem Aufrühren bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach wenigstens 24 Stunden wurde das Kieselgur abgenutscht, mit Wasser säurefrei gewaschen und dann mit einem Liter Pyridin versetzt. Die weitere Behandlung erfolgte analog der Salzsäurereinigung. Das pyridinfrei gewaschene Material wurde 24 Stunden bei 110°C getrocknet und anschließend fraktioniert gesiebt, die Fraktion 80 - 100 mesh weiter benützt.

Zur Beladung des so vorbehandelten Chromosorbs wurden 20 g in eine Lösung von 10 g NPGS in 100 ml Chloroform (über eine basische Al_2O_3 -Säule gereinigt) eingetragen. Der Ansatz wurde unter schwachem Vakuum (kein Sieden der Lösung) eine Stunde stehen gelassen und dann in einem Guß abgenutscht. Dabei nicht erfaßtes Material wurde getrennt aufgearbeitet, um eine einheitliche Beladung des Chromosorbs zu erzielen. Nach mehrstündiger Lufttrocknung wurde das Material über Nacht bei 110°C gehalten und schließlich zur Bestimmung der Beladung zurückgewogen.

β. Füllung der Trennsäule.

1/8'' Edelstahlrohr wurde mit Wasser und organischen Lösungsmitteln gereinigt und zu einer für den Gaschromatographen passenden Spirale aufgewickelt. Das eine Ende des Rohres wurde mit einem Glaswollpfropf verschlossen, das andere Ende mit einem Einfülltrichter verbunden. Unter schwachem Ansaugen (Wasserstrahlpumpe) und gleichmäßigem Beklopfen der Säule wurde das beladene Trägermaterial eingefüllt. Nach beendeter Füllung wurde auch das andere Ende der Säule mit Glaswolle verschlossen,

die Trennsäule dann im Gaschromatographen montiert und im schwachen Heliumstrom (10 ml/min) mit $15^{\circ}/h$ erhitzt. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur verblieb die Säule noch 12 bis 24 Stunden zum "Ausheizen" im Gaschromatographen.

7. Gaschromatographie

25-50 μ l der zu analysierenden Probe wurden in den $230 - 250^{\circ}C$ heißen Injektor des Gaschromatographen eingespritzt. Die Substanztrennung erfolgte in der sich anschließenden, 3 m langen $1/8''$ -Säule, die mit dem gewünschten Trennmaterial (NPGS oder SE 30) gefüllt war. Die Temperatur des Säulenofens war abhängig vom Trennproblem. Für die Analyse der gesättigten Fettsäuren verwendeten wir im allgemeinen ein lineares Temperaturprogramm: Beginnend mit $175^{\circ}C$ wurde mit einer Heizrate von $2^{\circ}C/min$ oder $4^{\circ}C/min$ auf $230^{\circ}C$ (bei NPGS) aufgeheizt und dann bei dieser Temperatur weiter isotherm gearbeitet. Ein Heliumstrom von ca. 24 ml/min transportierte die Substanzen zum Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Heizstromstärke der WX-Filamente 150 mA, bei präparativen Arbeiten 100 mA; Temperatur des Detektorblockes 300 bzw. $250^{\circ}C$). Vom Detektorausgang gelangten die Substanzen über eine heizbare ($300^{\circ}C$) Verbindungsleitung in das auf $750^{\circ}C$ vorgeheizte CuO-Rohr des Verbrennungsofens, wo sie zu $^{14}CO_2$ und H_2O verbrannten. Nach Absorption des Wassers in einem $MgClO_4$ -Rohr durchströmte das $He/^{14}CO_2$ -Gemisch die mit Anthracenkristallen gefüllte Durchflußzelle des Szintillationszählers. Ein dahintergeschaltetes Natronasbestrohr verhinderte den Austritt des $^{14}CO_2$ in die Umgebung.

8. Auswertung und Kontrollen

Massenregistrierung

Bei allen Messungen der Produktverteilung interessierte nur die relative Häufigkeit der einzelnen Säuren im Ansatz, die durch die Radioaktivitätsverteilung bestimmt wurde. Eine etwaige Verschiebung der ursprünglichen relativen Verteilung durch verschie-

den starke Aufarbeitungsverluste der einzelnen Säuren konnte durch den Zusatz definierter Trägermengen kontrolliert werden. Dazu wurde ein genau eingewogenes Trägergemisch in Äther gelöst, ein Aliquot mit Diazomethan verestert und steigende Mengen davon gaschromatographisch analysiert. Aus diesen Chromatogrammen wurden nach der Methode "Halbwertsbreite mal Höhe" die Flächenverhältnisse der Säuren zueinander bestimmt. Aus dem nicht veresterten Trägergemisch wurde der Äther abgezogen, der Rückstand in 10 %iger methanolischer KOH gelöst und jeweils ein Aliquot dieser Lösung zum Abstoppen der Inkubationsansätze eingesetzt. Aus dem ursprünglichen Mengenverhältnis und dem nach Aufarbeitung gefundenem konnten unterschiedliche Aufarbeitungsverluste der einzelnen Säuren korrigiert werden. Eine solche Korrektur war jedoch nur bei den kurzkettigen Säuren (bis C₈) erforderlich.

Radioaktivitätsregistrierung

Durch den Trägerzusatz konnte die Konstanz der ursprünglichen Produktverteilung bis zur Massenregistrierung (also bis zum Detektor des Gaschromatographen) kontrolliert werden. Bis zur Radioaktivitätsregistrierung der einzelnen Säuren war noch ein kritischer Punkt der Meßeinheit zu beachten: Die Verbindungsleitung vom Detektorausgang bis zum Verbrennungsrohr hätte noch eine Verfälschung der Produktverteilung verursachen können und zwar immer dann, wenn in dieser Strecke "kalte Stellen" vorhanden gewesen wären. An diesen kalten Stellen würden bevorzugt die langkettigen Säuremethylester kondensieren und so der Radioaktivitätsregistrierung entgehen. Aus diesem Grund wurde vor jeder Analysenserie die Anlage mit einem ¹⁴C-Stearinsäuremethylesterstandard bekannter spezifischer Radioaktivität auf ihre einwandfreie Funktion hin überprüft.

Bei allen Versuchen zur Verschiebung der Endproduktverteilung in der Fettsäuresynthese wurde grundsätzlich immer die Produktverteilung des Standardinkubationsansatzes (S. 95) als Referenz vor jeder Analysenserie gemessen. Mit dem bekannten C₁₆/C₁₈-Säure-Verhältnis dieses Ansatzes war eine weitere Kontrolle der Meßanlage gegeben.

Während der digitalen Integration des Radioaktivitätsgipfels einer Verbindung wurde

zwei- bis dreimal die Gasdurchflußgeschwindigkeit (Seifenblasen-Strömungsmesser) gemessen und Schwankungen bei der Radioaktivitätsauswertung wie bei (76) beschrieben berücksichtigt, was jedoch im allgemeinen nicht erforderlich war.

Die Untergrundimpulse (unmittelbar vor Erscheinen der betreffenden Verbindung bestimmt) während der Integrationszeit wurden von den registrierten Werten abgezogen.

Die räumliche Trennung von Massen- und Radioaktivitätsregistrierung hat unter den beschriebenen Strömungsbedingungen eine zeitliche Verschiebung von 30 ± 5 sec. zwischen Massen- und Radioaktivitätsaufzeichnung zur Folge. Diese zeitliche Verschiebung ist in den abgebildeten Gaschromatogrammen berücksichtigt und korrigiert.

b) Standardansatz der enzymatischen Fettsäuresynthese.

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen von 2 ml: 200 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, 0,8 mg Serumalbumin, 1,2 μ Mol NADPH, 0,25 μ Mol $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (ca. 10 μ C/ μ Mol), und 200 γ Fettsäuresynthetase (spez. Akt.: 1500 - 2500 mE/mg). Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 μ Mol Malonyl-CoA gestartet und ihr Verlauf optisch an der Extinktionsabnahme bei 366 m μ verfolgt. Temperatur: 25°C. Abstoppen der Synthese noch im linearen Geschwindigkeitsbereich nach 1 - 10 Minuten durch Zusatz von 1 ml 10 % KOH in Methanol, das außerdem definierte Mengen der zu bestimmenden Verbindungen als Träger enthielt (in der Regel 1 μ Mol).

c) Aufarbeitung der Inkubationslösungen für die Radiogaschromatographie.

Der abgestoppte Inkubationsansatz wird 30 min bei 70°C gehalten. Nach Ansäuern mit 12 N H₂SO₄ wird dreimal mit je 3 ml Petroläther (KP: bis 40°C) extrahiert, und der Extrakt über Na₂SO₄ getrocknet. Die konzentrierte Petrolätherlösung wird mit Diazomethanolung versetzt, eingeeengt und die gebildeten Fettsäuremethylester in Essigester aufgenommen und radiogaschromatographisch analysiert.

d) Synthese ungeradzahliger Fettsäuren.

Wie Standardansatz, jedoch statt Acetyl-CoA 0,25 μMol unmarkiertes Propionyl-CoA und 0,5 μMol 2- ^{14}C -Malonyl-CoA (1 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) eingesetzt. Bei der Auswertung der Produktverteilung wurde der steigende Gehalt der Fettsäuren an markiertem Kohlenstoff mit wachsender Kettenlänge berücksichtigt.

e) Endproduktverschiebungen durch Variation der Acetyl- und Malonyl-CoA-Konzentration.

Im Experiment der Fig. 13 wurde gegenüber dem Standardansatz kein Acetyl-CoA eingesetzt, jedoch zusätzlich 2,6 mE Malonyl-CoA-Decarboxylase zugegeben, die nach OESTERHELT (16) aus FSS bereitet wurde: 10 - 30 mg Enzymprotein (1500 - 2000 mE/mg) werden mit 10^{-2} M Jodacetamid 10 min bei 0°C inkubiert, anschließend wird durch Sephadex G-25-Filtration überschüssiges Jodacetamid entfernt. Das so behandelte Enzym hat seine Fähigkeit zur Fettsäuresynthese verloren, decarboxyliert aber 0,3 μMol Malonyl-CoA pro min und mg zu Acetyl-CoA (1 E = 1 μMol Malonyl-CoA pro min).

Im Experiment der Fig. 13 B wurde gegenüber dem Standardansatz statt 0,25 μMol 4,5 μMol Acetyl-CoA im Inkubationsansatz eingesetzt.

f) Die Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel.

Für die Synthese kurzkettiger Fettsäuren (Fig. 14) wurde folgender Inkubationsansatz gewählt: 2 ml enthalten 100 μMol Tris pH 7,5, 20 μMol MgCl_2 , 20 μMol K-Citrat, 7 μMol Glutathion, 7 μMol KOH, 50 μMol KHCO_3 , 1,5 mg Serumalbumin, 0,4 μMol 1- ^{14}C -Acetyl-CoA (10 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$), 1,2 μMol NADPH, 600 mE FSS, 10,7 mE Acetyl-CoA-Carboxylase. Start nach 5 min mit 7 μMol ATP. 25°C .

Die verwendete Acetyl-CoA-Carboxylase war nach (77) gereinigt und von Dr. Henniger zur Verfügung gestellt. Der Enzymtest wurde ebenfalls wie in (77) beschrieben durchgeführt.

g) Endproduktverschiebungen durch Guanidin · HCl.

Die kondensierende Teilaktivität wurde in Anlehnung an (5) wie folgt bestimmt: Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0,3 ml: 50 μMol Tris pH 7,5, 2 μMol $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ ($4 \cdot 10^6$ Z./min), 5 μMol Cystein, 5 μMol EDTA, 0,15 μMol CoA, 30 μMol S-Acetyl-N-acetylcysteamin und die angegebene Menge Guanidin · HCl. Start mit 0 - 80 μ Enzym. Stop nach 10 min mit 0,2 ml Eisessig. Ein Aliquot wurde auf Whatman I Papier aufgetragen und die säurestabile Radioaktivität gemessen. Jeder Meßpunkt repräsentiert die durch eine Enzymabhängigkeit mit 10, 20, 40 und 80 μ bestimmte Aktivität in der Kondensation (1E = 1 μMol CO_2 incorporiert pro min).

Die Teilaktivität der Palmityl-Übertragung wurde nach (15) bestimmt. Anstelle von CoA wurde aber das Substratmodell N-Acetylcysteamin als Acceptor in den Test eingesetzt. Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 1 ml: 100 μMol K-Phosphat pH 6,5, 5 μMol N-Acetylcysteamin, 0,4 mg Serumalbumin, 10 μ Fettsäuresynthetase; nach 5 min Vorinkubation Start mit 14 μMol $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA ($1,8 \cdot 10^5$ Z./min). Nach 30 sec (Inkubationstemperatur 20°C) wird mit Perchlorsäure gestoppt und das mit Petroläther extrahierbare N-Acetyl-S-palmitylcysteamin im Szintillationszähler bestimmt.

Der Test zeigt unter diesen Bedingungen eine lineare Zeitabhängigkeit von 0 bis 90 sec. Da Palmityl-CoA bereits in geringsten Konzentrationsbereichen eine vom Protein/Palmityl-CoA-Verhältnis abhängige Enzymhemmung bewirkt, ist eine lineare Proteinabhängigkeit dieses Tests nur in engen Konzentrationsbereichen zu beobachten. Für die relativen Aktivitätsbestimmungen in Fig. 15, die immer unter identischen Konzentrationsverhältnissen ausgeführt wurden, war diese Tatsache deshalb ohne Einfluß.

h) 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Methyltridecylketons. (78)

0,4 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 2 ml konz. H_2SO_4 aufgenommen, vorsichtig mit 3 ml H_2O versetzt und mit 10 ml 95 %igem Alkohol (acetaldehydfrei) aufgefüllt. Das gaschromatographisch isolierte Trägerketon (zusammen mit der zu identifizierenden Radioaktivität) wurde in 0,02 ml Alkohol gelöst und mit 0,02 ml der obigen Reagenslösung versetzt. Nach kurzem Erwärmen wurde die Reaktionsmischung auf Kieselgel G Dünnschichtchromatographie-Platten (15 min bei 110°C aktiviert) aufgetragen und mit Petroläther/Benzol 1:3 als Laufmittel entwickelt (79). Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Dünnschicht-Scanner bestimmt.

i) Semicarbazon des Methyltridecylketons (80)

Das gaschromatographisch isolierte Trägerketon, das die zu identifizierende radioaktive Substanz enthielt, wurde mit zusätzlichen 20 mg Methyltridecylketon versetzt und in alkoholischer Lösung mit 1 ml der folgenden Reagenslösung in das Semicarbazon überführt: 300 mg Semicarbazid $\cdot$ HCl, 300 mg Natriumacetat in 4 ml Wasser/Alkohol (1 : 1 V/V).

Es bildet sich sofort ein kristalliner Niederschlag, der aus den auf S. 42 angegebenen Lösungsmitteln bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert wurde.

k) Überführung der Ketone in die entsprechenden Alkohole und deren Methyläther-derivate.

Ein Drittel eines Ätherextraktes, der Fettsäuren und die Ketone enthielt, wurde direkt mit Diazomethan behandelt und radiogaschromatographisch analysiert (Fig. 25). Die restlichen Zweidrittel des Ansatzes wurden vom Lösungsmittel befreit und in 0,5 ml Alkohol aufgenommen, mit 0,5 ml m/2 KBH_4 in Alkohol/ H_2O (1 : 1) versetzt und

bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Überschüssiges KBH_4 wurde durch Zugabe von konz. HCl zerstört und die Reaktionsprodukte durch dreimaliges Ausschütteln mit je 3 ml Petroläther extrahiert. Der Extrakt wurde mit Diazomethan und zusätzlich 0,02 ml einer $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ -Lösung (reines $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ wurde 1 : 100 mit Äther verdünnt) behandelt (dadurch werden nach (81, 82) Alkohole in ihre Methyläther überführt) und dann ebenfalls gaschromatographiert (Fig. 25).

l) Die Endprodukte der Fettsäuresynthese mit limitierenden Mengen NADPH.

Der Standardansatz (S. 95) enthielt kein NADPH, jedoch zusätzlich ein NADPH erzeugendes System: 20 μMol MgCl_2 , 2,5 μMol Glucose-6-phosphat, 1,25 μMol NADP^+ und 140 mE Glucose-6-phosphatdehydrogenase (83).

m) Oxidativer Abbau des 2-Hexadecensäuremethylesters (35).

Der gaschromatographisch isolierte Träger 2-Hexadecensäuremethylester (ca. 1 μMol) (der die zu identifizierende radioaktive Verbindung enthielt) wurde nach Abziehen des Essigesters (vgl. S. 41) in 0,8 ml Aceton gelöst und mit 10 μMol KMnO_4 (Lösung in Aceton) versetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 25°C wurden 1 ml H_2O und 0,2 ml 12 N H_2SO_4 zugegeben, die Reaktionsprodukte mit Äther extrahiert und nach Veresterung mit Diazomethan der radiogaschromatographischen Analyse unterworfen.

n) Synthese von 2-Hexadecensäure durch FMN-freie Fettsäuresynthetase.

Native Fettsäuresynthetase wurde nach der von LYNEN (5) beschriebenen Methode ins Apoenzym überführt. Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 1 ml : 100 μMol K-Phosphat pH 6,5, 0,4 mg Serumalbumin, 0,5 μMol NADPH, 0,1 μMol Myristyl-CoA, und 2 mg FSS-Apoenzym. Die Synthese wurde durch Zugabe von 0,2 μMol 2- ^{14}C -Malonyl-CoA gestartet. Nach einer Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,6$ (334 m μ) wurde alkalisch gestoppt und wie üblich (S. 95) aufgearbeitet.

9. Zu Kapitel V

a) Michaeliskonstanten der Substratmodelle

Der Standardenzymtest der Fettsäuresynthetase enthielt statt Acetyl-CoA 3 $\mu\text{Mol/ml}$ S-Acetyl-N-acetylcysteamin und steigende Mengen S-Malonyl-N-capryloylcysteamin, wie in Fig. 34 angegeben bzw. steigende Mengen S-Acetyl-N-acetylcysteamin, wie in Fig. 33 eingezeichnet und 1 $\mu\text{Mol/ml}$ S-Malonyl-N-capryloylcysteamin.

b) Syntheseprodukte mit Substratmodellen

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 2 ml: 200 μMol K-Phosphat pH 6,5, 0,8 mg Serumalbumin, 1,2 μMol NADPH, 1 μMol S-1- ^{14}C -Acetyl-N-acetylcysteamin (15 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$), 200 μg Fettsäuresynthetase (1500 mE/mg) und 2 μMol S-Malonyl-N-capryloylcysteamin. Der Ansatz wurde wie auf S. 95 beschrieben aufgearbeitet und radiogaschromatographisch untersucht. Im Experiment der Fig. 37 wurde statt NADPH NADH eingesetzt.

c) Triacetsäurelaktonebildung mit Substratmodellen

Folgender Inkubationsansatz wurde gewählt: 200 μMol K-Phosphat pH 6,5, 20 μMol Cystein, 1 μMol S-1- ^{14}C -Acetyl-N-acetylcysteamin (15 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$), 3 μMol S-Malonyl-N-capryloylcysteamin und 3 mg FSS (spez. Akt. 1900 mE/mg), H_2O ad 1 ml. Inkubation 120 min bei 0°C . Gestoppt wurde mit 0,2 ml 10 %iger HClO_4 . Nach Zusatz von 4 μMol authentischem Triacetsäurelaktone wurde viermal mit je 3 ml Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde dann zur Überführung des Triacetsäurelaktone in das 4-Methoxytriacetsäurelaktone mit Diazomethan bei Raumtemperatur behandelt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und radiogaschromatographisch analysiert.

10. Zu Kapitel VI

a) Dissoziation der Fettsäuresynthetase (90).

Die Spaltung des Enzyms wurde wie folgt ausgeführt: eine Enzymlösung in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6,5 oder 0,1 M Trispuffer pH 7,5 mit 10-15 mg Protein/ml wurde mit NaCl oder LiCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M versetzt und in einem Trockeneis-Alkohol-Kältebad (ca. -70°C) eingefroren und etwa 15 min bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde der Vorgang ein- bis mehrere Male wiederholt.

Die so vorbehandelte Enzymlösung wurde dann direkt (z. B. für die analytische Ultrazentrifuge) zur weiteren Untersuchung verwendet oder wie folgt entsalzt: das Protein wird mit 240 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, abzentrifugiert, in Trispuffer pH 7,5 der jeweils benötigten Ionenstärke konzentriert gelöst und über eine Sephadex-G 25-Säule filtriert, die mit dem entsprechenden Trispuffer äquilibriert ist. Alle Operationen müssen bei 0°C ausgeführt werden. Die entsalzte Proteinlösung kann dann direkt für die analytische Diskelektrophorese benützt werden.

b) Rekonstitution der gespaltenen Fettsäuresynthetase (90)

Das mit der beschriebenen Methode inaktivierte und gespaltene Enzym kann wie folgt reaktiviert werden: Der Spaltansatz wird wenigstens fünffach mit 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,5, der 40 mM an Cystein ist, verdünnt und bei 20°C inkubiert. Auch die Dialyse des Spaltansatzes gegen den gleichen Puffer, der zusätzlich 10^{-4} M FMN enthält, führt zur Rekonstitution der Fettsäuresynthetase.

c) Diskelektrophorese.

Apparative Ausrüstung (84)

Die apparative Anordnung ist in Fig. 55 wiedergegeben. Sie besteht im wesentlichen aus zwei Plastikkästen mit Platin-Elektroden. In den Boden der oberen Plastikdose sind drei Löcher gebohrt, in denen die Glasröhrchen mit Gummidichtungen befestigt werden. Zwei verschieden große Glasrohrtypen zur Aufnahme des Trenngels wurden

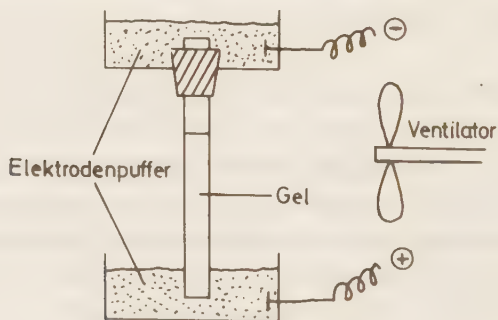


Fig. 55: Apparative Anordnung bei der Diskelektrophorese.

verwendet: 8 * 0,6 cm und 15 * 0,8 cm-Rohre. Im allgemeinen erwiesen sich die größeren Rohre für die photographische Wiedergabe der Elektrophoresemuster geeigneter.

Zusammensetzung des Trenngel-Systems.

Alle beschriebenen Diskelektrophoresen wurden im folgenden Gelsystem (85) durchgeführt:

Lösung A	1 N HCl	48 ml
	Tris	36,6 g
	Temed ⁺)	0,23 ml

H₂O ad 100 ml
(pH 8,9 bei 22°C)

Lösung B	Acrylamid	20,0 g
	Bis ⁺)	0,53 g
	H ₂ O	ad 100 ml

Lösung B'	Acrylamid	13,5 g
	Bis ⁺)	0,4 g
	H ₂ O	ad 100 ml

Lösung C	Per ⁺)	0,14 g
	H ₂ O	ad 100 ml

Elektrodenpuffer-Lösung:	Tris	6,0 g
	Glycin	28,8 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	(pH 8,3 bei 22°C)	

Zum Gebrauch: 10 %ige wässrige Lösung.

Das 5 %ige Polyacrylamidtrenngel wird durch Mischen von

A : B : C : H₂O im Verhältnis 1 : 2 : 4 : 1,

das 3,4 %ige Polyacrylamidtrenngel durch Mischen von

A : B' : C : H₂O im Verhältnis 1 : 2 : 4 : 1

hergestellt.

Trenngel-Bereitung

Ein unten mit Parafilm abgedichtetes Glasrohr wird 11 cm hoch mit Trenngellösung

+) Temed = N, N, N', N' - Tetramethyläthylendiamin Bis = N, N' - Methylbisacrylamid
Per = Ammoniumperoxodisulfat

aufgefüllt (bei den kleineren Röhren 3,5 cm hoch) und vorsichtig mit Wasser überschichtet, um bei der Polymerisation eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur ist der Polymerisationsvorgang im allgemeinen beendet.

Auf die Verwendung eines Sammelgels wurde grundsätzlich verzichtet, da mit diesem Verfahren keine besseren Trennleistungen bei den beschriebenen Versuchen erzielt werden konnten. Es war dagegen vorteilhaft, auf 5 %ige Trenngele eine 0,5 cm hohe 3 %ige Gelschicht zu polymerisieren, um eine rasche Vortrennung der Spaltstücke zu ermöglichen (Startausfälle konnten dadurch eingeschränkt werden).

Mehrere Autoren (86, 87) empfehlen die vollständige Entfernung noch vorhandenen Ammoniumpersulfats im Trenngel, um mögliche Artefaktbildung durch Oxidation von Proteinthiolgruppen zu verhindern. Zwei Methoden bieten sich an: Entweder kann der Elektrodenpuffer mit m/1000 Thioglycolsäure versetzt werden oder das Trenngel kann im Trenngelpuffer einer Vorelektrophorese unterworfen werden. Durch beide Vorichtsmaßnahmen war bei Spaltansätzen keinerlei Änderung der Elektrophoresemuster zu beobachten, so daß wir im allgemeinen auf diese Maßnahmen verzichten konnten.

Ausführung der Elektrophorese

Die Elektrophoreseapparatur wurde, wie in Fig. 55 skizziert, im Kühlraum (+ 4°C) aufgestellt und Kathoden- und Anodenkammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Probelösung, die zwischen 50 und 200 γ Protein (bei kleinen Gelröhrchen 10 bis 50 γ) enthielt und außerdem 1 M an Saccharose war, wurde durch vorsichtiges Unterschichten der Pufferlösung auf das Gel aufgetragen (0,01 bis 0,1 ml). Die Elektrophorese wurde mit maximal 5 mA pro Röhrchen durchgeführt. Die Laufzeiten betrugen zwischen 3 und 6 Stunden, bei großen, 1 bis 2 Stunden bei kleinen Gelen. Während der Elektrophorese wurden die Gelrohre zusätzlich mit einem Ventilator gekühlt.

Färben und Entfärben der Gele.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel mit einer Injektionsspritze von der Glaswand abgelöst und aus dem Rohr gedrückt. Eine 30 bis 60 min lange Inkubation in 7 %iger Essigsäure mit 0,5 % Amidoschwarz dient zur Färbung und Fixierung der Proteinbanden. Die Entfärbung erfolgt in 7 %iger Essigsäure durch mehrmaligen Wechsel des Mediums. Der Zeitaufwand beträgt bei dieser Methode 2 Tage. Wesentlich kürzere Zeiten benötigt die elektrophoretische Entfärbung in 7 %iger Essigsäure (1 bis 3 Stunden). Hierzu wird das gefärbte Gel in ein gebogenes Glasrohr eingeführt (vgl. Fig. 56), das gleichzeitig als Strombrücke zwischen zwei Elektrophoresewannen dient.

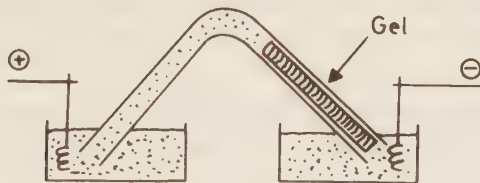


Fig. 56: Anordnung zur elektrophoretischen Entfärbung

Der überschüssige Farbstoff wird dann mit 20 mA/Gel aus dem Gel entfernt, die fixierten und gefärbten Proteinbanden verändern dabei ihre Position nicht.

Auswertung

Die Elektrophoresemuster wurden entweder im Densitometer ausgewertet oder photographiert. Bei den Versuchen mit ^{14}C -Fettsäuresynthetase mußte die Radioaktivitätsverteilung im Gel bestimmt werden. Wir bedienten uns einer von SHEPHERD (88) aus-

gearbeiteten Methode: Das Gel mit den angefärbten Proteinbanden wurde mit einer Rasierklinge in 1 bis 3 mm dicke Scheibchen geschnitten. Die einzelnen Gelscheibchen wurden zusammen mit 0,7 ml 6 N HCl in Glasampullen eingeschmolzen und 16 Stunden bei 120°C gehalten. Nach beendeter Hydrolyse der Gelscheibchen (auch der bei der Radioaktivitätsmessung störende Farbstoff wird zerstört) wurden die Proben zentrifugiert, Aliquote des Hydrolysates auf Whatman I Papier aufgetragen und im Szintillationszähler gemessen.

d) Analytische Ultrazentrifuge

Die experimentellen Daten, wie Umdrehungszahl, Laufzeit, Proteinkonzentration und Lösungsmittelsystem sind in den Legenden der betreffenden Figuren angegeben.

Alle Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden mit 2° Aluminiumzellen bei einer Schichtdicke von 12 mm ausgeführt. Verwendeter Rotortyp: AN-D.

e) Zuckergradientenzentrifugation

Analog der Methode von MARTIN und AMES (47):

In Zentrifugenbechern wurde im Gesamtvolumen von 30 ml ein Gradient von 5 - 20 % Saccharose aufgebaut. Der Zucker war in 0,1 M Trispuffer pH 7,5 gelöst, der zusätzlich 0,5 M an NaCl oder LiCl (ausnahmsweise auch 1 M) war. Der Gradient stand vor Benutzung wenigstens 2 Stunden im Kühlraum bei 4°C. Pro Becher wurden 5 - 10 mg Protein in 0,5 - 1,0 ml Lösungsvolumen aufgesetzt. Nach 35 bis 40 stündiger Zentrifugationsdauer bei ca. 0°C und bei 24 000 UpM wurden die Becher am Boden angestochen und Fraktionen von je 1 ml in graduierten Reagensgläsern gesammelt. Die Proteinverteilung wurde durch Ausmessen der optischen Dichte bei 280 m μ bestimmt.

f) Fettsäuresynthetase-Test.

Der Standardenzymtest ist auf S. 87 beschrieben.

g) Enzymtest der 1. Reduktion.

Der Test wird wie von LYNEN (5) angegeben ausgeführt:

Eine Küvette enthielt im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, 0,4 mg Serumalbumin, 0,2 μ Mol NADPH und 1 - 10 γ Enzymprotein. Nach 2 bis 3 Minuten langer Beobachtung des Blindlaufes bei 334 m μ und 25°C wird die Reaktion mit 5 μ Mol S-Acetacetyl-N-acetylcysteamin gestartet. (1 Einheit = 1 μ Mol S-Acetacetyl-N-acetylcysteamin-Verbrauch/Minute).

h) Enzymtest der 2. Reduktion (Diaphorase-Aktivität).

Die Bestimmung wurde nach HAGEN (44) in Anlehnung an SEUBERT (89) ausgeführt:

Eine Küvette enthielt im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, 40 m μ Mol Dichlorphenolindophenol, 0,2 μ Mol NADH; die Reaktion wird mit 1-5 γ Enzymprotein gestartet und die Extinktionsabnahme bei 578 m μ und 25°C gemessen.

(1 Einheit ist die Menge Enzym, die 1 μ Mol Dichlorphenolindophenol pro Minute reduziert).

i) Aktivitätsbestimmung der Katalase im Zuckergradienten.

Auf den Zuckergradienten wurden entweder alleine oder zusammen mit den Fettsäuresynthetase-Spaltstücken 200 γ Katalase aufgesetzt. 0,02 ml der einzelnen Fraktionen wurden dann für den Enzymtest eingesetzt (83): Eine Quarzküvette enthielt im Volumen 3 ml: 2,98 ml Peroxid-Lösung (0,05 ml 30 %iges Perhydrol mit 0,05 M K-Phosphat pH 7,0 auf 50 ml aufgefüllt), nach Zugabe von 0,02 ml der Probelösung wird die

Extinktionsabnahme bei 240 m μ und 25°C gemessen.

k) ^{14}C -Fettsäuresynthetase.

^{14}C -Pantothensäure wurde in Anlehnung an WIELAND et al. (91), wie von SCHWEIZER (15) angegeben, synthetisiert:

4,1 mg (46,1 μMol) $1\text{-}^{14}\text{C}$ - β -Alanin (4,8 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0,462 ml 0,1 N KOH ins Kaliumsalz überführt und zur vollständigen Entfernung des Wassers 48 h im Vakuum über P_2O_5 aufbewahrt. Der Rückstand wurde mit 0,15 ml abs. Methanol aufgenommen und mit 7,8 mg (60 μMol) Pantolakton versetzt. Die Lösung wurde 60 h bei 40°C inkubiert, dann eingengt und in Wasser aufgenommen.

Ausbeutebestimmung: Absteigende Chromatographie mit n-Butanol: Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1 v/v) auf Whatman I Papier.

Radioaktivitätsverteilung: 90 % an der Stelle der Pantothensäure ($R_f = 0,74$), 10 % an der Stelle des β -Alanins ($R_f = 0,28$).

Das Zuchtmedium war nach MÜCKE (92) zusammengestellt, jedoch wie von WINNE-WISSER (10) angegeben ergänzt:

Glucose	50	g/L	DL-Methionin	20	mg/L
KH_2PO_4	0,55	"	DL-Tryptophan	20	"
MgSO_4	0,125	"	Asparagin	1880	"
CaCl_2	0,125	"	meso-Inosit	25	"
KCl	0,4	"	Biotin	0,2	"
MnSO_4	2,5	mg/L	Thiamin*HCl	0,4	"
FeCl_3	2,5	"	Pyridoxin*HCl	0,4	"
$\text{K}_3\text{-Citrat}$	5,0	g/L	Niacin	0,4	"
Citronensäure	1,0	"	p-Aminobenzoesäure	0,2	"
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,75	"	^{14}C -Pantothen	0,8-1,2	$\mu\text{Mol/L}$
L-Histidin	10	mg/L			

Zur Aufzucht wurde ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*⁺⁾ benützt, der heterotroph in Bezug auf Pantothensäure war. Die Zuchtbedingungen wurden wie von WELLS et al. (45) beschrieben gewählt. Die Hefe wurde am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (nach 35-40 h) geerntet.

Die Anreicherung der markierten Fettsäuresynthetase erfolgte nach der üblichen Methode (vgl. S. 86), jedoch wurde statt der Zonalzentrifugation eine Zuckergradientenzentrifugation in einem 10-30 %igen Gradienten bei 24 000 UpM als letzter Reinigungsschritt durchgeführt.

Ausbeuten: Aus 48 Liter Medium konnten 900 g Hefe (Feuchtgewicht) geerntet werden.

Daraus wurden 100 mg radioaktive FSS isoliert.

Spez. Enzymaktivität: 2700 mE/mg

Spez. Radioaktivität: 12000 IpM/mg

(gezählt in Toluol, aufgetragen auf Whatman I Papier).

+) von W. Winnewisser zur Verfügung gestellt.

VIII. Zusammenfassung

Eine optische Bestimmungsmethode für die nicht-thioesterartigen Acetyl- und Malonyl-Acceptorstellen am Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase wurde ausgearbeitet.

Der spezifische Kettenabbruch auf der Stufe der Palmitin- bzw. Stearinsäure in der Fettsäurebiosynthese ließ sich mit Hilfe eines Modells quantitativ erklären. Die Modellvorstellung nimmt einen hydrophoben Bereich als eine Art zweite Bindungsstelle am transferierenden Teilenzym an. Zusammen mit dem bekannten Syntheseablauf am Multienzymkomplex ließ sich damit sowohl die Produktverteilung unter Normalbedingungen erklären, als auch die z. T. erheblichen Verschiebungen des Produktspektrums bei veränderten Synthesebedingungen: Insbesondere konnte die Abhängigkeit der Produktverteilung von den relativen Substratkonzentrationen beschrieben werden. Limitierende Mengen NADPH im Inkubationsansatz sollten die zusätzliche Synthese von β -Ketoacyl-CoA- und α, β -ungesättigten Acyl-CoA-Verbindungen zur Folge haben, was experimentell bestätigt werden konnte.

Es wurde beobachtet, daß auch die Substratmodelle S-Acetyl-N-acetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloylcysteamin die Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex ermöglichen.

Durch Einfrieren und Auftauen salzhaltiger Fettsäuresynthetaselösungen (1 M NaCl oder LiCl) läßt sich der Multienzymkomplex in Untereinheiten zerlegen, die die Fähigkeit zur Fettsäuresynthese verloren haben. Unter geeigneten Bedingungen konnte die Rekonstitution des Multienzymkomplexes erreicht werden, die Fettsäuresynthese-Aktivität wurde dabei bis zu 50 % des Ausgangswertes wiederhergestellt. Die Spaltstücke wurden durch radioaktive Markierung, Diskelektrophorese, Zuckergradientenzentrifugation und Ultrazentrifugation näher charakterisiert.

IX. Literaturverzeichnis

- 1 Reed, L. J. und Cox, D. J., Ann. Rev. Biochem. 35 (1967) 57
- 2 Green, D. E., Murer, E., Hultin, H. O., Richardson, S. H., Salmon, B., Brierley, G. P., und Baum, H., Arch. Biochem. Biophys. 112 (1965) 635
- 3 Koike, M., Reed, L. J., und Carroll, W. R., J. Biol. Chem. 235 (1960) 1924
- 4 Hsu, R. Y., Wasson, G., und Porter, J. W., J. Biol. Chem. 240 (1965) 3736
- 5 Lynen, F., Federation Proc. 20 (1961) 941
- 6 Martin, D. B., Horning, G. M., und Vagelos, P. R., J. Biol. Chem. 236 (1961) 663
- 7 Becker, E. M., und Kumar, S., Biochemistry 4 (1965) 1839
- 8 Lynen, F., S. B. bayer. Akad. Wiss., Sitzung vom 4. März 1960
- 9 Lynen, F., Hopper-Kessel, I., und Eggerer, H., Biochem. Z. 340 (1964) 95
- 10 Winnewisser, W., Diplomarbeit, Universität München 1969
- 11 Willecke, K., Ritter, E., und Lynen, F., European J. Biochem. 8 (1969) 503
- 12 Vagelos, P. R., Majerus, P. W., Alberts, A. W., Larrabee, A. R. und Ailhaud, G. P., Federation Proc. 25 (1966) 1485
- 13 Lynen, F., Oesterheld, D., Schweizer, E., und Willecke, K., Cellular Compartmentalization and control of Fatty Acid Metabolism, Universitetsforlaget Oslo 1968, 1-24

- 14 Pilz, J., Kratky, O., et al., European J. Biochem. (1970) im Druck
- 15 Schweizer, E., Dissertation, Universität München 1963
- 16 Oesterhelt, D., Dissertation, Universität München 1967
- 17 Pauling, L., Nature of the Chemical Bond, Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1960
- 18 Van Wazer, J. R., Phosphorus and Its Compounds, Vol. I, Interscience, N. Y., 1958
- 19 Schomaker, V., und Stevenson, D. P., J. Amer. Chem. Soc., 63 (1941) 37
- 20 Ellman, G. L., Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 443
- 21 Oesterhelt, D., Bauer, H., und Lynen, F., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. (1969) im Druck
- 22 Lynen, F., in Proceedings of the R. A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research, V, 293, Houston, Texas, 1962
- 23 Lynen, F., in: New Perspectives in Biology, S. 132, Elsevier Publishing Company Amsterdam, 1964
- 24 Ziegenhorn, J., Dissertation, Universität München 1970
- 25 Harris, J., Nature 197 (1963) 154
- 26 Ziegenhorn, J., unveröffentlichte Versuche
- 27 Majerus, P. W., Alberts, A. W., und Vagelos, P. R., J. Biol. Chem. 240 (1965) 4723

- 28 Pugh, E. L., und Wakil, S. J., J. Biol. Chem. 240 (1965) 4727
- 29 Brooks, J. L., und Stumpf, P. K., Biochim. Biophys. Acta 98 (1965) 213
- 30 Lennarz, W. J., Light, R. J., und Bloch, K., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 48 (1962) 840
- 31 Lynen, F., The Third Jubilee Lecture, Biochem. J. 102 (1967) 381
- 32 Nemethy, G., und Scheraga, H. A., J. Chem. Phys. 36 (1962) 3401
- 33 Bartley, J. C., Abraham, S., und Chaikoff, I. L., Biochim. Biophys. Acta 144 (1967) 51
- 34 Smith, S., und Dils, R., Biochim. Biophys. Acta 116 (1966) 23
- 35 Fieser, L. F., und Fieser, M., Organische Chemie, Verlag Chemie 1965, S. 1212 .
- 36 Van der Ven, B., Haverkamp-Begemann, P., und Schogt, J. C. M., J. Lipid Res. 4 (1963) 91
- 37 Wong, N. P., Patton, S., und Forss, D. A., J. Dairy Sci. 41 (1958) 1699
- 38 Parks, O. W., Keeney, M., Katz, J., und Schwartz, D. P., J. Lipid Res. 5 (1964) 232
- 39 Lawrence, R. C., und Hawke, J. C., Biochem. J. 98 (1966) 25
- 40 Merckenschlager, M., Schlossmann, K., und Kurz, W., Biochem. Z. 2, 329 (1957) 332

- 41 Lineweaver, H. und Burk, D., J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658
- 42 Yalpani, M., Willecke, K., und Lynen, F., European J. Biochem. 8 (1969) 495
- 43 Willecke, K., Dissertation, Universität München 1968
- 44 Hagen, A., Dissertation, Universität München 1963
- 45 Wells, W. W., Schultz, J., und Lynen, F., Biochem. Z. 346 (1967) 474
- 46 Determann, H., Gelchromatographie, Springer-Verlag, Berlin 1967
- 47 Martin, R. G., und Ames, B. N., J. Biol. Chem. 236 (1961) 1373
- 48 Sumner, J. B., und Gralen, N., J. Biol. Chem. 125 (1938) 33
- 49 Chilson, O. P., Costello, L. A., und Kaplan, N. O., Federation Proc. (1965) S. 55
- 50 Leibo, S. P., und Jones, R. F., Arch. Biochem. Biophys. 106 (1964) 78
51. Gehring, U., und Riepertinger, C., European. J. Biochem. 6 (1968) 261
- 52 Morse, D. E., Chan, W., und Horecker, B. L., Proc. Natl. Acad. Sci. 58 (1967) 628
- 53 Koike, M., Reed, L. J., und Carroll, W. R., J. Biol. Chem. 238 (1963) 30
- 54 Simon, E. J., und Shemin, D., J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953) 2520

- 55 Wieland, T., und Rueff, L., Angew. Chem. 65 (1953) 186
- 56 Eggerer, H., und Lynen, F., Biochem. Z. 335 (1962) 540
- 57 Hurlbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A. F., und v. Potter, R., J. Biol. Chem. 209 (1954) 23
- 58 Sumper, M., Oesterheld, D., Riepertinger, C., und Lynen, F., European J. Biochem. 10 (1969) 377
- 59 Wessely, L., Dissertation, Universität München 1955
- 60 Vogelmann, D., Diplomarbeit, Universität München 1952
- 61 Kuhn, R., und Quadbeck, G., Ber. 84 (1951) 844
- 62 Collie, N. J., J. Chem. Soc. 59 (1891) 609
- 63 Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czod, R., Garbade, K. H., Meyer-Ahrendt, E., und Pfeleiderer, G., Z. für Naturf. 8 b (1953) 555
- 64 Murphy, J. B., und Kies, M. W., Biochim. Biophys. Acta 45 (1960) 382
- 65 Buckel, W., und Eggerer, H., Biochem. Z. 343 (1965) 29
- 66 Ochoa, S., in: S. O. Colowick und N. O. Kaplan, Methods in Enzymology I, 687, Acad. Press N. Y. 1959
- 67 Stadtman, E. R., in: Methods in Enzymology III, (1962) 938
- 68 Decker, K., Die aktivierte Essigsäure, Enke Verlag, Stuttgart, 1959

- 69 Lynen, F., in: *Methods in Enzymology XIV* (1969) im Druck
- 70 Johnson, T. B., *J. Amer. Soc.* 28 (1906) 1458
- 71 Schwyzer, R., *Helv. Chem. Acta* 35 (1952) 1903
- 72 Gruber, W., *Dissertation, Universität Frankfurt* 1959
- 73 Grunert, R., und Philips, R., *Arch. Biochem. Biophys.* 30 (1951) 217
- 74 Toennis, G., und Kolb, J., *J. Anal. Chem.* 23 (1951) 823
- 75 Lands, W., und Hart, P., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1905
- 76 Hamprecht, B., *Dissertation, Universität München* 1968
- 77 Goto, T., Ringelmann, E., Riedel, B., und Numa, S.,
Life Science 6 (1967) 785
- 78 Shriner, R. L., Fuson, R. C., und Curtin, D. Y., *The Systematic Identification of Organic Compounds*, J. Wiley, N. Y., 1960
- 79 Randerath, K., *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie 1962
- 80 Baumgarten, P., *Ber.* 76 B (1943) 213
- 81 Caserio, M. C., *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 2584
- 82 Müller, E., *Angew. Chem.* 70 (1958) 105
- 83 *Biochemica Informationen*, C. F. Boehringer, Mannheim 1961
- 84 Reilsfeld, R. A., Lewis, U. J., und Williams, D. E., *Nature* 195 (1962) 281

- 85 Maurer, H. R. Diskelektrophorese, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin 1968
- 86 Mitchell, W. J., Biochim. Biophys. Acta 147 (1967) 171
- 87 Brewer, J. M., Science 156 (1967) 256
- 88 Shepherd, R. G., Canalco Abstract, Nr. 148 (1965)
- 89 Seubert, W., in: Methoden der enzym. Analyse, H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie 1962, Seite 433
- 90 Sumper, M., Riepertinger, C., und Lynen, F., FEBS Letters 5 (1969) 45
- 91 Wieland, Th., Maul, W., und Möller, E. F., Biochem. Z. 327 (1955) 85
- 92 Mücke, D., in: Einführung in mikrobiolog. Best. Verfahren, Seite 124, Leipzig, VEB G. Thieme, 1957

Lebenslauf

Am 28. 12. 1942 wurde ich in München geboren. Meine Eltern sind Dr. jur. Josef Sumper und Frau Lotte, geb. Hochenleitner.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in München, trat ich 1953 in die real-gymnasiale Abteilung des Wittelsbacher Gymnasiums in München ein und legte dort 1962 das Abitur ab. Im Wintersemester desselben Jahres begann ich an der Universität München das Chemiestudium, unterzog mich im Februar 1965 der Vordiplomprüfung und im Februar 1967 der Hauptdiplomprüfung. Im Laboratorium von Prof. Dr. F. Lynen führte ich von Mai 1967 bis Dezember 1969 die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

